

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİSORBAT 80 KAPLI, KURKUMİN VE DOSETAKSEL  
YÜKLÜ PLGA NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN  
GELİŞTİRİLMESİ VE BEYİN TÜMÖRÜ ETKİNLİKLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Indrit SEKO**

**Farmasötik Teknoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2020**

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım boyunca bana her aşamada destek olup çalışmalarına yön veren başta danışman hocam Prof. Dr. Yılmaz Çapan olmak üzere çalışmalarım sırasında ihtiyaç duyduğumda her an yanımda olan Prof. Dr. Güneş Esendağlı, Prof. Dr. İmran Vural ve Doç. Dr. Yeşim Aktaş'a

Beni Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Ailesi'ne kabul ederek tez çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için her türlü imkânı sağlayan başta Anabilim Dalı Başkanları Prof. Dr. Sema Çalış ve Prof. Dr. Levent Öner olmak üzere tüm Hocalarıma,

Doktora çalışmalarımız boyunca birlikte çalıştığımız ve desteklerini her an hissettiğim Dr. Ecz. Hayrettin Tonbul, Ecz. Sedenay Akbaş ve Yük. Kim. Müh. Gözde Ultav'a

Hücre kültürü çalışmalarımı gerçekleştirmeme izin veren Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı'na ve bu çalışmalar sırasında desteğini esirgemeyen Uzm. Mol. Bio. Ece Tavukçuoğlu ve Uzm. Mol. Bio. Hamdullah Yanık'a teşekkür ederim.

Karşılıksız ve şartsız, her zaman yanımda olan, zor günlerimdeki en büyük destekçim, sevgili Burcu Akar'a; kardeşimlere, anneme ve babama varlıkları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Seko, I. Polisorbat 80 Kaplı, Kurkumin ve Dosetaksel Yüklü PLGA Nanopartiküller Sistemlerin Geliştirilmesi ve Beyin Tümörü Etkinliklerinin Değerlendirilmesi. Hacettepe Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2020.** Merkezi sinir sistemi (MSS) ilaç taşınması araştırmacılar için bir zorluk oluşturmaktadır. Kan-beyin bariyeri (KBB) sistemik olarak uygulanan terapötik ajanların geçişini önemli ölçüde engeller ve beyin ekstrasellüler matrisi, lokal olarak uygulanan ajanların dağılımını ve kalış süresini sınırlandırmaktadır. Polisorbat 80 (Poly 80) kaplı Poli(laktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanopartikülleri (Poly 80-PLGA NP'ler) bu problemlere umut veren bir çözüm sunmaktadır. Polisorbat 80 (Tween® 80) ile kaplanmış ilaç yüklü PLGA nanopartiküller, intravenöz enjeksiyondan sonra beyin kanser tedavisinde kullanılan antineoplastik ilaçların etkili bir şekilde beyine taşınmasını sağlamaktadır. Yüksek yan etkileri ve direnci gelişen antineoplastik ilaç grubunda yer alan dosetaksel ile birlikte kullanılan kurkumin, dosetaksel dozunu azaltarak kanser tedavisinin yan etkilerini azaltmaktadır. Bu çalışmada, PLGA nanopartikülleri tekli emülsiyon yöntemi ile 3-değişkenli 3-seviyeli Box-Behnken tasarımı ile optimize edilmiş dosetaksel (DTX) ve kurkumin (CCM) yüklü PLGA NP'ler, polimer konsantrasyonu ( $X_1$ ), ilaç konsantrasyonu ( $X_2$ ) ve organik/su oranının ( $X_3$ ) bağımsız değişkenler ve partikül büyüklüğü ( $Y_1$ ), ilaç enkapsülasyon etkinliği ( $Y_2$ ) ve polidispersite (PDI) ( $Y_3$ ) olarak yanıtları kullanılmıştır. Hazırlanan Poly80-DTX-CCM-PLGA-NP'ler partikül boyutu, polidispersite, zeta potansiyeli, ilaç enkapsülasyon etkinliği, TEM/SEM görüntüleri ve FTIR analizi ile karakterize edilmiştir. bEnd.3 endotel ve U87 glioma hücrelerinde MTT testi yapılarak, güvenli PLGA nanopartikül miktarı belirlenerek, optimum formülasyon için U87 hücrelerde etkinlik değerlendirilmiştir. Ayrıca bEnd.3 hücrelerde alımı polisorbat 80 kaplamalı NP'lerin kaplamasız olan NP'lere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. In vivo olarak ise, Flamma 774 yüklü Poly 80-PLGA-NP enjekte edilen farelere in vivo görüntüleme sistemi (IVIS) kullanılarak KBB aşarak beyine geçişi gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kan-Beyin Bariyeri (KBB), Dosetaksel, Kurkumin, PLGA Nanopartiküller, Polisorbate 80 kaplama, Box-Behnken Tasarım

## ABSTRACT

**Seko, I. Synthesis, evaluation of in vitro and in vivo activities of curcumin and docetaxel loaded polysorbate 80 coated PLGA nanoparticulate systems. Hacettepe University Graduate School Health Sciences Institute, Pharmaceutical Technology Department, 2020.** Delivery of drugs in Central Nervous System (CNS) is a major challenge for researchers. The blood-brain barrier (BBB) significantly inhibits the delivery of systemically administered therapeutic agents to the brain and limits the distribution and longevity of the locally distributed agents in brain extracellular matrix. Polysorbate 80 (Poly 80) coated PLGA nanoparticles (Poly 80-PLGA NPs) offer a promising solution to these problems. Following the intravenous injection drug loaded PLGA nanoparticles coated with Polysorbate 80 (Tween 80) provide effective brain transport method for antineoplastic drugs used in brain cancer treatment. Plant-derived curcumin, which is used in combination with antineoplastic drug with high side effects such as docetaxel, reduces side effects of cancer treatment by reducing dose of docetaxel. In this study, curcumin and docetaxel loaded PLGA nanoparticles are prepared using single emulsion method, the formulation is optimized using Box-Behnken design with 3 independent factors in 3 level, as follows; polymer concentration ( $X_1$ ), drug concentration ( $X_2$ ) and solvent/water ratio ( $X_3$ ) and as response NP size ( $Y_1$ ), drug loading ratio ( $Y_2$ ) and polydispersity ( $Y_3$ ). The prepared Poly 80-DTX-CCM- PLGA-NPs were characterized by particle size, polydispersity, zeta potential, drug loading ratio, TEM/SEM images and FTIR analysis. MTT test was performed on bEnd.3 endothelial and U87 glioma cells and IC 50 values were calculated for optimum formulation. In bEnd.3 and U87 cell lines it was observed that polysorbate 80 coated PLGA NPs showed an increased uptake compared to non-coated PLGA NPs. In vivo, CD1 mice injected with Poly 80-DTX-CCM-PLGA-NPs were shown to have been transported through BBB into the brain using the in vivo imaging system (IVIS).

**Key Words:** Blood-Brain Barrier (BBB), Docetaxel, Curcumin, PLGA Nanoparticles, Polysorbate 80 coating, Box-Behnken Design

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET BEYANLARI	vi
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xvii
TABLolar	xx
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	4
2.1. Kan-Beyin Bariyeri	4
2.2. Nanopartiküller İlaç Taşıyıcı Sistemler	6
2.2.1. Poli (laktik-ko-glikolik asit) Nanopartiküller	7
2.2.2. PLGA Bazlı Piyasa Preparatları	13
2.3. Kurkumin	14
2.3.1. Kurkumin Farmakokinetik Özellikleri	17
2.3.2. Kurkumin ile Onkoloji Alanında Yapılan Klinik Çalışmalar	19
2.4. Dosetaksel	23
2.4.1. Dosetaksel Farmakokinetik Özellikleri	24
2.5. Tümörlere İlaç Taşıma Engelleri	25
2.5.1. Retiküloendotelyal Sistem ve Mononükleer Fagositik Sistem	25
2.5.2. İlk Geçiş Renal Filtreleme	26
2.5.3. Heterojen Kan Akımı	26
2.5.4. Yüksek Tümör İnterstisyel Basıncı	26
2.5.5. Ekstrasellüler Matriks	27
2.5.6. Hücre İçine Alımı	27

2.6. Hedeflendirme	27
2.6.1. Pasif Hedeflendirme	28
2.7. Deneysel Tasarım	29
2.7.1. Box-Behnken Tasarımı	30
2.8. Nanopartikül Kritik Parametreleri	31
2.8.1. Partikül Büyüklüğü	31
2.8.2. Partikül Yüzeyi	32
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	34
3.1.Kullanılan Maddeler ve Ekipman	34
3.2.Kurkumin ve Dosetaksel Miktar Tayini Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu	37
3.2.1. Kromatografik koşullar ve sistem	37
3.2.2. Stok ve Standart Çözeltilerin Hazırlanması	38
3.2.3. Özgünlük	39
3.2.4. Doğrusallık ve Aralık	39
3.2.5. Doğruluk ve Kesinlik	40
3.2.6. Gözlemlenebilirlik ve Tayin Edilebilirlik Sınırı	40
3.3.Polisorbat 80 Miktar Tayini	40
3.4.Kurkumin-Dosetaksel Yüklü Nanopartiküllerin hazırlanması	42
3.5. Nanopartikül karakterizasyonu	43
3.5.1. Nanopartiküllerin Morfolojisinin İncelenmesi	43
3.5.2. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Tayini	44
3.6. Risk Faktörlerinin Belirlenmesi	44
3.7. Dosetaksel-Kurkumin Nanopartiküllerinin Optimizasyonu: Box-Behnken Deney Tasarımı	45
3.8.Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi	49
3.9. Taramalı Elektron Mikroskopisi	49
3.10. Transmisyon Elektron Mikroskobu	50
3.11. Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Zeta Potansiyeli	50
3.12. Enkapsülasyon Etkinliği	50
3.13. In Vitro İlaç Salımı	51
3.14. In Vitro Hücre çalışmaları	51

3.14.1. Kurkumin ve Dosetaksel İçermeyen PLGA Nanopartiküllerinin biyoyumluluklarının İncelenmesi	52
3.14.2. Kurkumin ve Dosetaksel İçermeyen PLGA Nanopartiküllerinin biyoyumluluklarının İncelenmesi	53
3.14.3. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımlarının İncelenmesi	54
3.15. In Vivo Çalışmaları	55
3.16. İstatistiksel Analiz	55
<b>4. BULGULAR</b>	56
4.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonları	56
4.1.1. Dosetaksel Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonları	56
4.1.2. Kurkumin Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu	60
4.1.3. Polisorbat 80 Yöntem Validasyonu	64
4.2. Dosetaksel ve Kurkumin Yüklü Nanopartiküllerinin Optimizasyonu: Box-Behnken Deney Tasarımı	66
4.3. Enkapsülasyon Etkinliği	78
4.4. Polisorbat 80 Miktar Tayini	79
4.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi	80
4.6. Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleme	83
4.7. Transmisyon Elektron Mikroskopu	85
4.8. Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Zeta Potansiteli	87
4.9. In Vitro İlaç Salımı	90
4.10. In Vitro Hücre Çalışmaları	92
4.10.1. Kurkumin ve Dosetaksel içermeyen PLGA Nanopartiküllerinin biyoyumluluklarının İncelenmesi	92
4.10.2. Dosetaksel ve Kurkumin Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksitelerinin İncelenmesi	94
4.10.3. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımlarının İncelenmesi	99
4.11. In Vivo Çalışmaları	102
<b>5. TARTIŞMA</b>	104
5.1. Kurkumin ve Dosetaksel Etkin Maddelerin Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyonu	104

5.2. Dosetaksel ve Kurkumin Yüklü Nanopartiküllerinin Optimizasyonu: Box- Behnken Deney Tasarımı	104
5.3. Dosetaksel-Kurkumin Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	106
5.4. Hücre Kültür Çalışmaları	110
5.4.1. Kurkumin ve Dosetaksel İçermeyen PLGA Nanopartiküllerinin biyouyumluluklarının İncelenmesi	110
5.4.2. Kurkumin ve Dosetaksel Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksitelerinin İncelenmesi	112
5.4.3. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımlarının İncelenmesi	113
5.5. In Vivo Çalışmaları	114
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	116
<b>7. KAYNAKLAR</b>	119
<b>8. EKLER</b>	
<b>Ek-1. ETİK KURUL ONAYI</b>	
<b>Ek-2. Deney Hayvan Sertifikası</b>	
<b>Ek-3. Turnitin Çıktısı</b>	
<b>Ek-4. Dijital Makbuz</b>	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>5-FU</b>	5-Fluoro Urasil
<b>ACN</b>	Asetonitril
<b>Apo A1</b>	Apolipoprotein A1
<b>Apo B</b>	Apolipoprotein B
<b>Apo E</b>	Apolipoprotein E
<b>BAX</b>	Bcl-2-bağlantılı X Protein ( <i>Bcl-2-associated X protein</i> )
<b>bEnd.3</b>	Beyin-kaynaklı Endotelyal Hücreler.3 ( <i>brain-derived Endothelial cells.3</i> )
<b>CCM</b>	Kurkumin ( <i>Curcumin</i> )
<b>CD1</b>	Kanser Çalışmalarında Kullanılan Fare Türü
<b>COX</b>	Siklooksijenaz ( <i>Cyclooxygenase</i> )
<b>CYP3A4</b>	Sitokrom P450 3A4
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modifiye Eagle's Hücre Kültür Besleme Çözeltilisi
<b>DMF</b>	Dimetilformamid
<b>DOE</b>	Deney Tasarım ( <i>Design of Experiment</i> )
<b>Dox</b>	Doksorubisin ( <i>Doxorubicin</i> )
<b>DTX</b>	Dosetaksel ( <i>Docetaxel</i> )
<b>DUSP-2</b>	Çift Spesifisite Protein Fosfataz 2 ( <i>Dual Specificity Protein Phosphatase 2</i> )
<b>EpCAM</b>	Epitel Hücre Adezyon Molekülü ( <i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i> )
<b>EPR</b>	Arttırılmış Geçirgenlik ve Alıkonma ( <i>Enhanced Permeability and Retention</i> )

<b>ERK</b>	Hücreler Arası Sinyal Düzenleyen Kinaz ( <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i> )
<b>FBS</b>	Fetal Bovin Serum
<b>FDA</b>	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi ( <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>FOLFIRI</b>	Folinik Asit + 5-Fluoro Urasil + İrinotekan HCl Kemoterapi Protokol
<b>FTIR</b>	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi ( <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> )
<b>G2 / M</b>	Büyüme 2 / Mitoz ( <i>Growth 2 / Mitosis</i> )
<b>GB</b>	Görünür Bölge
<b>GBM</b>	Glioblastoma
<b>HPLC</b>	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
<b>HSA</b>	İnsan Serum Albumin ( <i>Human Serum Albumin</i> )
<b>hTERT</b>	Telomeraz Ters Transkriptaz ( <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i> )
<b>ICH</b>	Uluslararası Uyum Konseyi ( <i>International Council for Harmonisation</i> )
<b>INOS</b>	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz ( <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> )
<b>IVIS</b>	In Vivo Görüntüleme Sistemi ( <i>In Vivo Imaging System</i> )
<b>JNK</b>	c-NH <sub>2</sub> -Terminal Kinaz ( <i>c-Jun NH<sub>2</sub>-Terminal Kinases</i> )
<b>KBB</b>	Kan-Beyin Bariyeri ( <i>Blood-Brain Barrier</i> )
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>MDR</b>	Çoklu İlaç Direnci ( <i>Multiple Drug Resistance</i> )
<b>MMP</b>	Matris Metaloproteinaz ( <i>Matrix Metalloproteinast</i> )
<b>MPS</b>	Mononükleer Fagositik Sistem ( <i>Mononuclear Phagocytic System</i> )
<b>mRNA</b>	Haberci RNA ( <i>Messenger RNA</i> )

<b>MSS</b>	Merkezi Sinir Sistemi
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolyum bromid
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nükleer Faktör Aktif B Hücre Kapa-Hafif-Zincir-Arttırıcı ( <i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells</i> )
<b>NP</b>	Nanopartikül
<b>OFAT</b>	Bir Deney Bir Faktör ( <i>One Factor At a Time</i> )
<b>OSCAT</b>	Ostrosarkoma
<b>PBCA</b>	Poli(butil siyanoakrilat)
<b>PBS</b>	Fosfat Tampon Tuzu
<b>PDGF</b>	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü ( <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> )
<b>PDI</b>	Polidispersite
<b>PEG</b>	Polietilen Glikol
<b>P-gp</b>	P-gliokoprotein
<b>PLGA</b>	Poli (laktik-ko-glikolik asid)
<b>Poly 80</b>	Polisorbat 80
<b>PVA</b>	Polivinil Alkol
<b>Q2</b>	Kalite Bölüm 2 ( <i>Quality Chapter 2</i> )
<b>QbD</b>	Tasarım ile Kalite ( <i>Quality by Design</i> )
<b>RES</b>	Retikuloendotelyal Sistem ( <i>Reticuloendothelial System</i> )
<b>RMT</b>	Reseptör Aracılı Taşıma ( <i>Receptor Mediated Transport</i> )
<b>RSM</b>	Tepki Yüzey Yöntemi ( <i>Response Surface Methodology</i> )
<b>RT</b>	Radyasyon Tedavisi ( <i>Radiation Treatment</i> )
<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )

<b>SEM</b>	Taramalı Elektron Mikroskobu ( <i>Scanning Electron Microscope</i> )
<b>TEM</b>	Transmisyon Elektron Mikroskopi ( <i>Transmission Electron Microscope</i> )
<b>TGF</b>	Dönüşüm Büyüme Faktörü ( <i>Transforming Growth Factor</i> )
<b>TKI</b>	Tirozin Kinaz İnhibitör
<b>TMZ</b>	Temozolamid
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>VEGF</b>	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )

## ŞEKİLLER

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. Kan-Beyin bariyerini oluşturan yapılar	5
2.2. Kan-beyin bariyerini geçerek beyine ilaç taşıma stratejileri ve mekanizmaları. Kan-beyin bariyeri, sıkı kavşaklar aracılığı ile birbirlerine kenetlenmiş negatif yüklü vasküler endotel hücre katmanından oluşmaktadır	6
2.3. Emülsiyon Difüzyon Yöntemi ile PLGA NP hazırlama aşamaları	11
2.4. Zerdeçal rizomasında bulunan kurkuminoid bileşikler	14
2.5. Kurkuminin çeşitli anti-kanser özelliklerini gösteren akış şeması	16
2.6. Dosetaksel kimyasal yapısı	23
2.7. Pasif ve aktif ilaç hedeflendirme stratejiler kanser dokusu üzerinde farklılıklar	28
3.1. Kurkumin ve dosetaksel yüklü PLGA nanoparküllerinin üretim akış şeması	38
3.2. Nanopartiküllerinin kritik kalite özelliklerini etkileyebilecek formülasyon ve proses parametrelerin özeti	40
4.1. 5.6. dk gelen dosetaksel pikidir. Pik saflığı %100 olarak gösterilmiştir	56
4.2. Dosetaksel analitik yöntemine ilişkin regresyon doğrusu. Y pik alan ve X dosetaksel konsantrasyonunu göstermektedir	57
4.3. 9.7. dk gelen kurkumin pikidir. Pik saflığı %100 olarak gösterilmiştir	59
4.4. Dosetaksel analitik yöntemine ilişkin regresyon doğrusu. Y pik alanını ve X dosetaksel konsantrasyonunu göstermektedir	60
4.5. Normal olasılık grafikleri: a) partikül büyüklüğü, b) PDI ve c) kurkumin enkapsülasyon etkinliği	66

- 4.6. Kurkumin ve dosetaksel yüklü nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü üzerine yağ/su oranı, kurkumin konsantrasyonu ve PLGA konsantrasyonunun etkisini gösteren kontur grafikleri 68
- 4.7. Kurkumin ve dosetaksel yüklü nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü üzerine yağ/su oranı, kurkumin konsantrasyonu ve PLGA konsantrasyonunun etkisini gösteren yüzey cevap grafikleri 69
- 4.8. Kurkumin ve dosetaksel yüklü nanopartiküllerinin PDI üzerine yağ/su oranı, kurkumin konsantrasyonu ve PLGA konsantrasyonunun etkisini gösteren kontur grafikleri 70
- 4.9. Kurkumin ve dosetaksel yüklü nanopartiküllerinin PDI üzerine yağ/su oranı, kurkumin konsantrasyonu ve PLGA konsantrasyonunun etkisini gösteren yüzey cevap grafikleri 71
- 4.10. FTIR spektrumları: a) PLGA, b) dosetaksel, c) kurkumin, d) dosetaksel-kurkumin-PLGA fiziksel karışımı, e) dosetaksel-kurkumin yüklü PLGA NP ve f) polisorboborbat 80 kaplı dosetaksel-kurkumin yüklü PLGA NP 76
- 4.11. Dosetaksel ve kurkumin yüklü nanopartiküllerin SEM görüntüsü 79
- 4.12. Dosetaksel ve kurkumin yüklü PLGA nanopartiküllerin TEM görüntüsü 81
- 4.13. DLS ile ölçülen partikül büyüklüğü ve dağılımı a) F11 b) F15 ve c) Optimum Formülasyon 83
- 4.14. Box-Behnken deney tasarımı kapsamında elden edilen kurkumin ve dosetaksel yüklü PLGA nanopartiküllerin optimum formülasyonuna ilişkin in vitro a) dosetaksel ve b) kurkumin salım profilleri 86
- 4.15. a) 24.saat, b) 48.saat ve c)72.saat asit uçlu boş PLGA NPler, ester uçlu boş PLGA NPler, polisorbobat 80 kaplamalı ve kaplamasız bEnd.3 endotel hücrelerinde sitotoksisite değerleri 88
- 4.16. Kurkumin çözeltinin U87 hücre hatı a) 48.saat ve b) 72.saatlerde sitotoksisite 90
- 4.17. Dosetaksel çözeltinin U87 hücre hatı 120.saatte sitotoksisite sonuçları 91

4.18.	Zamana bağlı dosetaksiel U87 hücrelerde sitotoksisite değişimi	91
4.19.	Dosetaksiel ve kurkumin farklı oranlarda sitotoksisite değerleri	92
4.20.	Dosetaksiel ve kurkumin yüklü PLGA Nanopartiküller sitotoksisite değerleri	93
4.21.	U87 ve bEnd.3 hücrelerinde polisorbata 80 kaplı ve kaplama olmayan PLGA NP'lerin ortalama floresan yoğunluklarına histogram sonuçları	95
4.22.	a) U87 ve b) bEnd.3 hücrelerinde kaplı ve kapsız PLGA NP'lerin ortalama floresan yoğunluklarına göre hücreye alım grafikleri	95
4.23.	bEnd.3 ve U87 hücre hattına uygulanan polisorbata 80 kaplamalı ve kaplamasız formülasyonların kırmızı ve mavi kanaldaki görüntüleri ile bu görüntülerin birleştirilmiş halleri.	96
4.24.	2. saatin sonunda CD1 farelerin IVIS ile alınan beyin görüntüleri. A) polisorbata 80 kaplamasız flamma 774 yüklü PLGA NP ve B) polisorbata 80 kaplı flamma 774 yüklü PLGA NP (n = 3)	98
4.25.	2. saatin sonunda CD1 farelerin IVIS ile alınan karaciğer, akciğer, kalp, böbrekler ve dalak organ görüntüleri. A) polisorbata 80 kaplamasız flamma 774 yüklü PLGA NP ve B) polisorbata 80 kaplı flamma 774 yüklü PLGA NP	99

**TABLÖLAR**

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. PLGA bazlı piyasa preparatları	13
2.2. Kanser ile ilgili kurkumin güncel klinik çalışmaları	19
2.3. Üç düzey ve üç faktörlü bir Box-Behnken tasarım matrisi. Pozitif değerler faktörlerin yüksek düzeylerini, negatif değerler faktörlerin düşük düzeyini, sıfır değeri ise faktörler için orta düzeyi ifade etmektedir	31
3.1. Tez çalışmasında kullanılan maddeler	34
3.2. Tez çalışmasında kullanılan ekipman	35
3.3. Kurkumin ve dosetaksel miktar tayini yöntemin kromatografik koşulları	38
3.4. Box-Behnken deney tasarımında kullanılan faktörler ve düzeyleri	46
3.5. Box-Behnken deney tasarımında sabit olarak tutulan formülasyon ve proses parametreleri	47
3.6. Deney tasarım formülasyonları	48
3.7. Dosetaksel konsantrasyon-partikül miktar dönüşüm tablosu	53
4.1. Dosetaksel stabilite verileri	58
4.2. Dosetaksel analitik yöntemine ilişkin doğruluk ve kesinlik parametreleri sonuçları (n = 3)	59
4.3. Kurkumin analitik yöntemine ilişkin doğruluk ve kesinlik parametreleri sonuçları (n = 3)	62
4.4. Farklı ortamda kurkumin stabilitesi % çözünmüş miktar olarak değerlendirilmiştir	63



4.5.	Polisorbat 80 analitik yöntemine ilişkin doğruluk ve kesinlik parametreleri sonuçları (n = 3).	66
4.6.	Box-Behnken deney tasarımı ile elde edilen bağımlı değişken değerleri	67
4.7.	Faktörlerin tahmin edilen regresyon katsayıları ve ilgili p değerleri	68
4.7.	Optimum formülasyon bileşenlerin miktarları	77
4.8.	Hedeflenen değerlerin fonksiyonu temel alınarak geliştirilen optimum Kurkumin ve dosetaksel yüklü nanopartikül formülasyonuna ilişkin deneysel ve tahmin değerler	77
4.9.	Box-Behnken deney tasarımı kapsamında hazırlanan formülasyonların kurkumin enkapsülasyon etkinliği değerleri (n = 3)	78
4.10.	Optimum formülasyonun kurkumin ve dosetaksel enkapsülasyon etkinliği değerleri (n = 3)	79
4.11.	Polisorbat 80 kaplama miktarları ile ilgili veriler	80
4.12.	Box-Behnken deney tasarımı kapsamından elde edilen optimum formülasyonun partikül büyüklüğü ve PDI verileri (n = 3). Polisorbat 80 ve ilaç enkapsülasyon ile meydana gelen partikül büyüklüğü ve PDI farkı özetlenmiştir.	88
4.13.	Box-Behnken deney tasarımı kapsamından elde edilen optimum formülasyonun zeta potansiyel verileri verileri (n = 3). Polisorbat 80 ve ilaç enkapsülasyon ile meydana gelen zeta potansiyel farkı özetlenmiştir.	88

## 1. GİRİŞ

Yaklaşık 100 yıl önce, uygun bir boyanın intravenöz enjeksiyonundan sonra, beyin dışındaki organların boyandığı gözlenmiştir. Bu durumun, beyin ve kan arasındaki kan-beyin bariyeri (KBB) olarak adlandırılan belirli bir yapıdan kaynaklı olduğu anlaşılmıştır (1). Bu yapı “kan-beyin bariyeri (KBB)” olarak tanımlanmıştır. KBB, aynı zamanda, terapötik ilaçların geçmesi için en karmaşık engellerden biridir ve KBB'nin yapısı nedeniyle, ancak uygun lipofilitesi, moleküler ağırlığı ve yükü olan birkaç küçük molekül, KBB'ye nüfuz edebilir ve merkezi sinir sistemine geçebilir (MSS). Küçük moleküllerin% 98'i ve hemen hemen tüm büyük moleküller (moleküler ağırlık > 1kDa, örneğin; rekombinant DNA veya gen bazlı ilaçlar) KBB'ne nüfuz edemedikleri gözlenmiştir (2). Farmakolojik olarak önemli miktarda KBB'yi geçmek için, bir molekülün moleküler ağırlığı <400 Da olmalı, uygun lipofilitesi olmalı ve p-glikoprotein (P-gp) gibi KBB'de bir aktif efflux taşıyıcı için bir substrat olmamalıdır (3).

Kanser hastalarının prevalansı yaşlanan nüfus ile artmaktadır ve bu hastalıkların tedavisi için birçok yeni bileşik geliştirilmiş ancak çoğu piyasaya ulaşamamıştır. Kötü huylu beyin tümörü, tanı ve tedavi için oldukça zor bir hastalıktır. Glioblastoma erişkinlerde en yaygın ve en ölümcül malign beyin tümörüdür ve glioma olarak adlandırılan bir grup tümörden biridir (4). Mevcut terapötik tedavi temelini oluşturan, maksimum güvenli cerrahi müdahale ve ardından eşzamanlı temozolamid (TMZ) ile birlikte radyasyon tedavisine (RT) (“Stupp rejimi”) rağmen ortalama sağkalım süresi 10-15 ay arasındadır (5, 6). Sitotoksikite, dağılım ve kan beyin bariyerini geçme yeteneği, beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılan kemoterapi için en önemli etmenlerden bazılarıdır. Beyin kanser hastalıklarının karmaşıklığına ek olarak, KBB ilaçların taşınması için uygun teknolojilerin eksikliği, MSS hastalıklarının tedavisi için ilaç geliştirmesini zorlaştırmaktadır. Son yıllarda bu bariyerin üstesinden gelmek için birçok strateji geliştirilmiştir. Diğer ilaç taşıma yöntemleri ile karşılaştırıldığında, nanopartiküller sistemler, azaltılmış sistemik yan etki ve cerrahi müdahaleye ihtiyaç olmaması nedeniyle en bilinen ilaç taşıma stratejilerinden biridir. Nanopartiküller taşıma sistemlerini geliştirerek, terapötik

ajanların fizikokimyasal, farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri iyileştirilebilmektedir. Nanopartiküller sistemleri küçük boyutlarından dolayı tümör bölgelerindeki damar endotel hücreler arasında açıklığın normal dokulara göre daha fazla olması sebebiyle, nanopartiküller ‘Arttırılmış Geçirgenlik ve Alıkonma’ (*Enhanced Permeability and Retention, EPR*) etkisi ile pasif hedeflendirme ile tümör bölgesinde toplanmaktadır.

Nanopartiküller farklı doğal veya sentetik materyallerle hazırlanabilir ve nanopartiküllerin karakterizasyonu istenilen hedef bölgeye ilacı ulaştırmak için kritiktir. Poli (laktik-ko-glikolik asid) (PLGA), biyoparçalanabilir (7, 8) ve biyouyumlu (9) olması nedeniyle biyomedikal uygulamalar için FDA onaylıdır. Kontrollü (10) ve sürekli (11) salım, *stealth* teknolojisi (12) ve hedeflendirme özellikleri ile ilaç taşımada yoğun olarak araştırılmaktadır. Polisorbat 80 sürfaktanı ile kaplama, beyine serbest şekilde geçemeyen terapötik ajanlar için bir 'altın standart' olarak kabul edilmiştir ve PLGA, poli (alkil siyanoakrilat) (13), insan serum albümini (14) ve katı lipit nanopartiküller (15) gibi farklı nanopartiküler sistemler ile birlikte kullanıldığında etkili olduğu kanıtlanmıştır. Sürfaktan kaplamasının kanda kalma süresinin arttırılmasının yanı sıra (16), başarılı beyin ilaç taşıma için anahtar rolü vardır. Polisorbat 80-kaplı PLGA (17) ve poli(butil siyanoakrilat) (PBCA) (18, 19) gibi nanopartiküller, seçici olarak belirli plazma proteinlerini (özellikle apolipoproteinler E ve B) kandan adsorbe eder ve bu proteinler (20), KBB'ni oluşturan endotel hücreler tarafından partiküllerin reseptör aracılı endositoz ile beyin içine taşınmasını kolaylaştırmaktadır (17, 21-24).

Dosetaksel, paklitaksel etkin maddesinin yarı sentetik şeklidir. İlaç, prelinik modellerde ve klinikte beyin kanserleri dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinde geniş bir antitümör spektrumu bulunmaktadır (25). Yan etkileri yüksek, düşük absorpsiyon ve ilk geçiş etkisi sebebiyle biyoyararlanımı (26) kişiden kişiye değişkenlik göstermekle birlikte %10'dan düşüktür (27). Fizikokimyasal (örneğin; çözünürlük) özelliklerinden dolayı oral kullanıma uygun olmamasından ve yukarıda bahsedilen özelliklerinden dolayı tez kapsamında etkin madde olarak dosetaksel seçilmiştir.

Kurkumin, doğal kaynaklı ve oral olarak iyi tolere edilen bir etkin maddedir. Son zamanlarda antikanser etkisi olduğu saptanmıştır (28-31). Kimyasal duyarlılığı (*chemosensitizing*) (32, 33) ve kimyasal koruyucu (*chemoprotective*) (34, 35) özelliklerinden dolayı dosetaksel ile kombine halde kullanılmasına karar verilmiştir (36, 37).

Sunulan bu tez çalışmasında öncelikli olarak Box-Behnken optimizasyon tasarımını kullanarak kurkumin ve dosetaksel etkin maddelerini kombine halde içeren PLGA NP'leri optimize edilmiştir. Elde edilen en iyi nanopartikül formülasyon seçilerek kurkumin varlığında dosetakselin antitümör etkisi ve elde edilen nanopartiküler sistemin polisrobot 80 kaplanması sonrası beyne geçiş etkinliği araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.Kan-Beyin Bariyeri

KBB, endotel hücrelerden oluşan seçici bir bariyerdir (Şekil 2.1.) (38). Bitişik endotel hücreleri arasındaki sıkı kavşaklar fiziksel bir bariyer olarak işlev görmektedir. Periferik damarlarda, moleküller transselüler yolla endotel hücrelerden geçebilir fakat KBB endotel hücrelerinde paraselüler taşımaya daha yaygındır (38). KBB endotel hücrelerin luminal ve abluminal yanlarında bulunan, belirli bileşiklerin taşınması için özel taşıyıcılar olan, gerekli bileşiklerin girişini kolaylaştıran fakat zararlı bileşiklerin geçişine izin vermeyen bir taşıma bariyeridir. Küçük lipofilik moleküller, lümen ve abluminal hücre zarları boyunca pasif difüzyon yoluyla beyne geçebilmektedir. Beyne pasif taşınmayı düzenlemek için, efflux pompaları birçok istenmeyen molekülü dolaşım sistemine geri döndürmektedir. Glikoz, amino asitler, organik anyonlar ve katyonlar ve nükleositler gibi küçük polar moleküller, taşıyıcı aracılı taşıma yoluyla kan-beyin bariyerini geçebilmektedir. Bu çözünen taşıyıcılar, bir moleküle spesifik olabilir veya birkaç moleküle çok spesifik olabilir. Proteinler ve peptidler gibi büyük çözünen maddeler, reseptör aracılı veya adsorpsiyon aracılı endositik taşıma ile KBB aşır beyne geçebilmektedir (39). Taşınmanın önemli rolünü vurgulayarak, nörovasküler üniteye tüm proteinlerin %10-15'inin taşıyıcı olduğu tahmin edilmektedir (40). Bu düzenlenmiş taşınmanın bir sonucu olarak, amino asitlerin ve proteinlerin konsantrasyonunda büyük farklılıklar olabilirken, kandaki ve beyin omurilik sıvısındaki iyonların konsantrasyonundaki farklılıklar nispeten küçüktür (41). Genel olarak, pasif hücre içine alım, suda çözünmesi için yeterli hidrofilitik ve lipit çift tabakasının hidrofobik çekirdeğinde çözünür olmak için yeterli lipofilitikliğine sahip küçük moleküllerle sınırlıdır. O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> gibi küçük gazlı moleküller, barbitüratlar, etanol ve kafein gibi küçük moleküller kadar hücre zarından da geçebilmektedir. Bununla birlikte, beyin endotel hücrelerindeki aktivitesi periferalden çok daha düşüktür (42). KBB'nin hidrofilitik ilaç girişini ciddi şekilde sınırlandırması ve beyne protein veya peptit gibi daha büyük

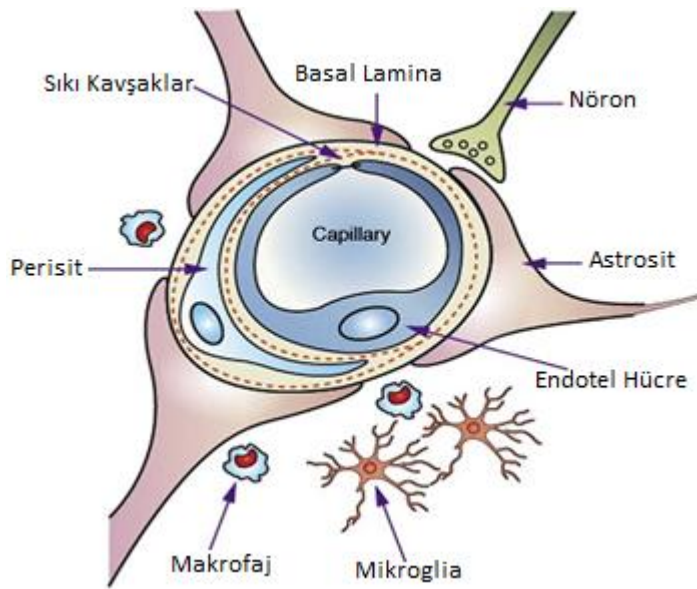
moleküllerin sınırlı penetrasyonu MSS ilaç geliştirme çalışmalarında dikkate alınmalıdır.

KBB içinde paraselüler veya transselüler kanalların bulunmaması sebebiyle dolaşımdaki moleküllerin beyine erişimi aşağıdaki iki mekanizmadan sadece biri aracılığıyla gerçekleşmektedir;

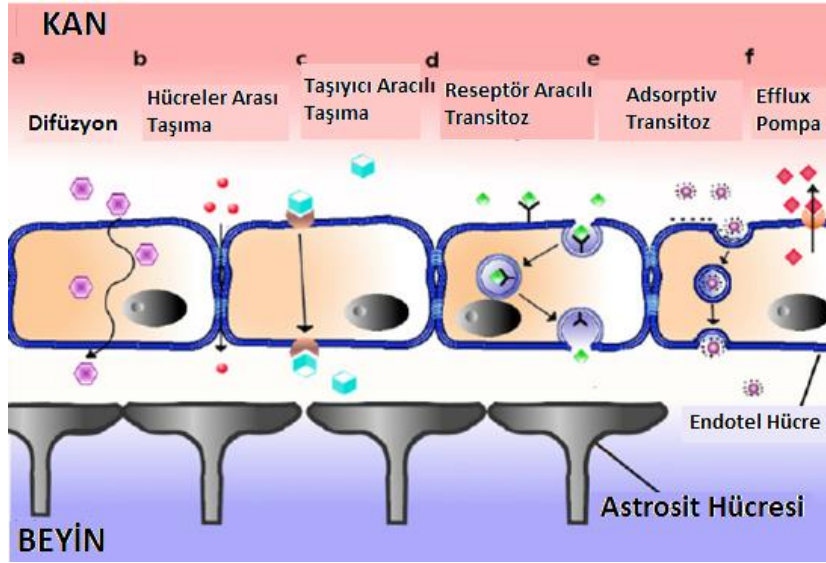
(1) serbest difüzyon

(2) KBB içinden taşıyıcı veya reseptör aracılı taşıma (RMT).

KBB endotel hücrelerini aşmak için kullanılan taşıma stratejileri Şekil 2.2.'de özetlenmiştir.



**Şekil 2.1.** Kan-Beyin bariyerini oluşturan yapılar (43)



**Şekil 2.2.** Kan-beyin bariyerini geçerek beyine ilaç taşıma stratejileri ve mekanizmaları. Kan-beyin bariyeri, sıkı kavşaklar aracılığı ile birbirlerine kenetlenmiş negatif yüklü vasküler endotel hücre katmanından oluşmaktadır (43). Beyine geçiş yolların aşağıdaki gibi özetlenmiştir;

- Difüzyon: küçük hidrofobik moleküllerin ve terapötik bileşiklerin beyine taşıma ana yoludur.
- Hücreler arası taşıma: küçük hidrofilik moleküllerin taşımada,
- Taşıyıcı aracılığı taşıma: beyin mikroçevrenin hemeostazisi için gerekli olan maddeleri (Örn. Glukoz, amino asit, nükleozit vb.) taşımada,
- Reseptör aracılığı transitoz: peptid ve uyarıcı molekülleri (insülin, leptin, interlökinler) ve besleyici maddeleri (Demir, Düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL)) taşımada,
- Adsorptive transitoz: Spesifik olmayan ve pozitif yüklü maddelerin taşımada kullanılır (serum proteinleri)

## 2.2. Nanopartiküller İlaç Taşıyıcı Sistemler

Son yıllarda, hücrelere ilaç taşıyarak insan sağlığının iyileştirilmesi için nanopartiküller (NP) sistemler kullanılmaya başlanmıştır. NP'ler, bu hücrelerin

doğrudan tedavi edilerek ilaçların etkinliğinin artırılmasına, yan etkilerin azaltılmasına ve genel olarak insan sağlığının iyileştirilmesine imkan veren, hasta hücrelere özel olarak ilacı taşıyacak şekilde tasarlanmıştır. Toz, kapsül, tablet veya sıvı gibi geleneksel ilaç uygulamalarının yüksek doz gereksinimi, düşük biyoyararlanım, hızlı ilk geçiş metabolizması ve zayıf farmakokinetik gibi önemli sınırlamaları vardır (44). Proteinler ve peptitler gibi bazı etkin ilaç adaylarının, gastrointestinal sistemdeki zayıf çözünürlükleri ve düşük absorpsiyonu sebebiyle, biyolojik sistemlerdeki zayıf terapötik etkinlikleri klinik çalışmalardaki başarısızlıklarının temel sebepleridir (45). Uygun olmayan fizikokimyasal özellikleri nedeniyle, zayıf çözünürlüğü olan bir ilaç adayı bile, nanopartiküller sistemleri kullanılarak iyileştirilmiş bir farmakokinetik / biyoyararlanım profili ile hedeflenen bölgeye etkili bir şekilde taşınabilmektedir (44, 46). Nöronal sistemde, ek bir koruma bariyeri olarak işlev gören kan-beyin bariyeri (KBB), nöronal sistemleri hedef alan çeşitli ilaç yüklü nanosistemler için hala büyük bir engel olarak oluşturmaktadır (14, 47). Nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu ile özelliklerini değiştirerek fagositik opsonizasyondan kaçarak kan-beyin bariyerine geçmesini sağlamak ve böylece beyin içindeki ilaç konsantrasyonu arttırmak mümkündür (48-50).

Nanopartiküller genellikle normal organlara zarar vermeden tümör dokusuna hedeflenen kemoterapötikleri taşıdıkları için, ilaç taşıyıcı olarak geliştirilmekte ve kullanılmaktadırlar. İdeal NP taşıyıcılarının özellikleri; biyoparçalanabilir, stabil, immünojenik olmayan, üretilmesi kolay, uygun maliyetli ve yüklenen terapötik ajanları sadece hedef bölgesinde serbest bırakabilmesidir. (51).

### **2.2.1. Poli (laktik-ko-glikolik asit) Nanopartiküller**

Biyoyumlu ve biyoparçalanabilir polimer formları, kemoterapötik ajanların biyoyararlanımını artırır ve bileşimlerinin bir özelliği olarak ilaçların sürekli ve zamana bağlı salımına izin verir, böylece kontrollü bir terapötik yaklaşım sağlamaktadır. İyi tasarlanmış bir nanopartiküller sistem, pasif hedeflendirme yoluyla hücre içine girebilmeli, endozomal kaçışa uğramalı ve düşük pH ve enzimatik bozulma

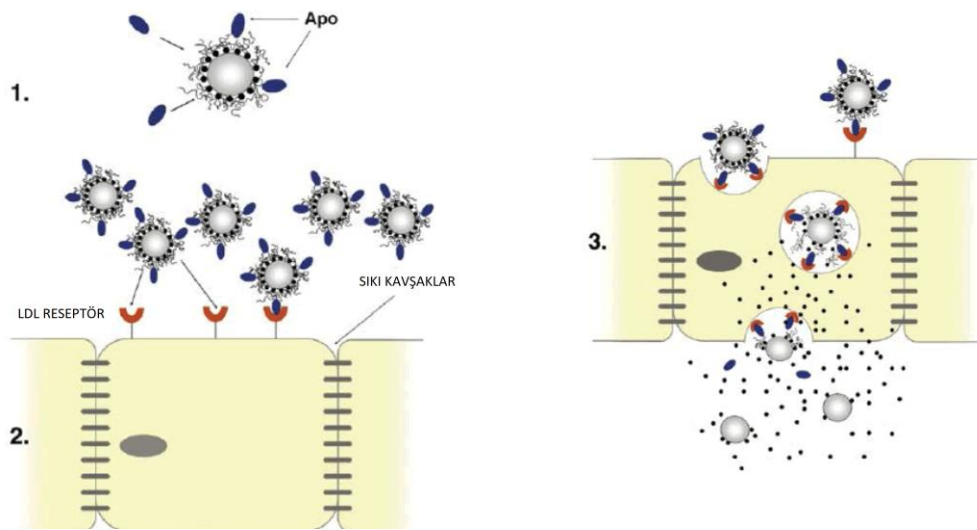


gibi sert hücre içi ortam koşulları nedeniyle lizozomlarda parçalanmaya karşı dayanıklı olmalıdır. Yaygın olarak kullanılan polimerlerden biri olan poli (laktik-koglikolik asit) (PLGA), biyouyumlu ve kolay modifiye edilebilir özellikleri nedeniyle birçok biyomedikal uygulamada kullanılan FDA ve EMA onaylı bir polimerdir (52). Biyolojik olarak uyumlu yapısı, kan dolaşım süresini uzatır, böylece enkapsüle edilmiş ilaçların plazma yarı ömrünü arttırır. Bunun yanı sıra hidrofobik ilaçlar için yüksek ilaç yükleme kapasitesi sunması, ilaçları hücre içine taşıması ve ilaçların bozunmaya karşı katı matris koruması gibi avantajları vardır.

İlaç taşıma sistemlerin istenilen yararı elde etmesi ve terapötik etki alanına ulaşması için kan dolaşımında yeterince uzun süre bulunması gerekmektedir. Hidrofobik yapısı nedeniyle, PLGA nanopartiküller retiküloendotel sistemi (RES) ile yüksek oranda opsonizasyona uğramaktadır. RES organlarının sebep olduğu opsonizasyona bağlı olarak kandan uzaklaştırmayı azaltmak ve nanopartikülün kanda dolaşım süresini uzatmak için, nanopartiküllerin etrafına çeşitli hidrofilik madde kaplama stratejileri geliştirilmiştir. Kanda kalış süresini arttırmak için nanopartiküller, polisorbitat 80, PEG (polietilen glikol), insan serum albümini (HSA) ve poloksamerler dahil olmak üzere, çeşitli hidrofilik kaplamalar PLGA nanopartiküllerine uygulanmıştır (53, 54). PLGA nanopartiküller, malign kanser hücreler içine alımını arttırabilen uygun hidrofilik kaplaması sayesinde, EPR etkisine bağlı olarak daha uzun süre hedef bölgesinde kalabilmektedir (55).

PLGA nanopartiküllerin polisorbitat 80 ile kaplanması, KBB boyunca beyne taşınmasını sağlayabilmektedir. Kaplama ajanı olarak kullanılan polisorbitat 80, efflux sistemini, özellikle P-glikoproteini (Pgp) inhibe edebilmektedir (56-58) ancak beyne taşınması için başka bir hücreye alım mekanizması bulunmaktadır (59). Polisorbitat 80 kaplamalı nanopartiküllerin kan akışına enjeksiyonundan sonra apolipoprotein E (Apo E) ve A1 (Apo A1) adsorpsiyonu sağlanmaktadır (60). PLGA nanopartiküllere adsorbe edilen proteinler, nanopartiküllerde enkapsüle edilmiş ilaçların kan-beyin bariyerini aşarak beyne geçmesini sağlamaktadır. Polisorbitat 80 kaplamalı PLGA nanopartiküllerinin, yüzeylerinde apolipoproteinlerin adsorpsiyonu nedeniyle, nanopartiküller lipoprotein gibi davrandığı düşünülmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, belirli apolipoproteinlerin nanopartiküllere bağlanarak enkapsüle edilmiş ilaçları KBB'yi aşarak beyne taşımak için uygun bir yöntem olduğu

bulunmuştur (61, 62). Diğer bir çalışmada, ApoE adsorpsiyonu ve KBB geçişi arasında açık bir bağlantı olduğun kanıtlanmıştır (Şekil 2.3.). Örneğin, polisorbitat 80 kaplamalı PLGA ve/veya apolipoprotein E veya B'nin konjuge edilmiş PLGA nanopartiküllerinin KBB'yi in vivo olarak geçmesi ve enkapsüle edilmiş ilaçları bu bariyerden geçirmesi mümkün olmuştur (22, 63, 64).



**Şekil 2.3.** Polisorbitat 80 kaplı nanopartiküllerin beyine taşıma şematize mekanizması (65)

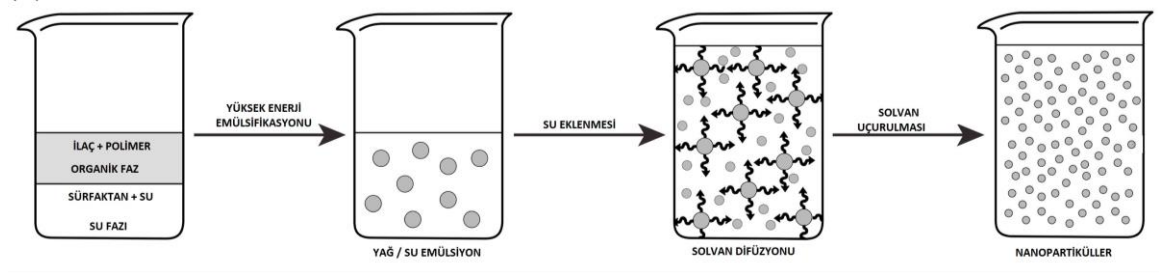
### PLGA Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

PLGA nanopartiküllerin sentezi için mevcut yöntemler iki sınıfa ayrılmaktadır; aşağıdan-yukarıya (bottom-up) ve yukarıdan-aşağıya (top-down). Emülsiyon veya mikroemülsiyon polimerizasyonu, arayüzey polimerizasyonu ve çöktürme polimerizasyonu gibi aşağıdan-yukarıya tekniklerde başlangıç noktası olarak bir monomer kullanılmaktadır. Emülsiyon buharlaşması, emülsiyon difüzyonu, çözücünün yer değiştirmesi (*solvent displacement*) ve tuzun uzaklaştırılması (*salting out*), yöntemleri ise önceden oluşturulmuş polimerden nanopartiküllerin sentezlendiği yukarıdan aşağıya tekniklerdir.

## Emülsiyon Difüzyon Yöntemi

Bu yöntemde, polimer (PLGA) su ile kısmen karışabilen organik bir solvanda (örneğin, etil asetat, benzil alkol veya aseton) çözülmetedir. Organik faz, karıştırılmakta olan iyonik olmayan polivinil alkol (PVA) gibi uygun bir yüzey aktif madde içeren bir çözelti ile emülsifiye edilmektedir. Organik çözücünün difüzyonu ve suyun emülsiyon damlacıklarına ters-difüzyonu polimer nanopartiküllerin oluşumuna neden olmaktadır (66). Tekli emülsiyon oluştuktan sonra koloidal yapıya enerji verilerek (Ultrasonikasyon veya homojenizatör) partikül büyüklüklerinin azalmasına ve homojen olması sağlanmaktadır (Şekil 2.4.). Emülsiyon Difüzyon Yöntemi ile sentezlenen nanopartiküllerin büyüklüğünü etkileyen önemli parametreler şunlardır: PLGA oranı, polimer konsantrasyonu, çözücü, yüzey aktif madde, polimer moleküler ağırlığı, viskozite, organik- su faz oranları, sıcaklık ve eklenen suyun akış hızı.

Bu tez kapsamında, üretim ve sentez kolaylığı, tekrarlanabilirlik ve etkinlik açısından PLGA hazırlama yöntemi olarak bu yöntem seçilmiştir.



**Şekil 2.4.** Emülsiyon Difüzyon Yöntemi ile PLGA NP hazırlama aşamaları

## Tuzların Uzaklaştırılması Yöntemi

Bu sentez yönteminde, polimer, aseton veya tetrahidrofuran gibi su ile karışabilen organik fazda çözülmetedir. Organik faz, sulu faza eklenerek, kuvvetli mekanik stres altında emülsifiye edilmektedir. Sulu faz, yüzey aktif madde ve organik fazda çözünmeyen yüksek bir konsantrasyonda tuz içermektedir. Emülsiyon difüzyon yönteminin aksine, çözücünün tuzların varlığından dolayı difüzyonu yoktur. Saf suyun yağ/su emülsiyonuna hızlı bir şekilde karıştırılmasıyla iyonik gücünü azaltır ve su ile karışabilen organik çözücünün sulu faza geçmesine neden olur, bu da nanosfer oluşumunu tetiklemektedir (67). Son aşama, tuz bileşimini çıkarmak için filtreleme veya santrifüjleme yoluyla saflaştırmaadır. Yaygın olarak tuz elektrolitler (sodyum klorür, magnezyum asetat veya magnezyum klorür) veya sukroz gibi elektrolitler kullanılmaktadır. Dikkate alınması gereken önemli parametreler: polimer konsantrasyonu ve moleküler ağırlık, karıştırma hızı ve süresi, yüzey aktif madde ve çözücünün kimyasal yapısı ve konsantrasyonu ve kriyoprotektan kullanımı.

### **Nanopresipitasyon Yöntemi**

Genel olarak, bu yöntem hidrofobik ilaçların enkapsülasyonunda kullanılmakla birlikte hidrofilik ilaçlar için de uyarlanabilmektedir. Polimer ve ilaç, aseton, asetonitril, etanol veya metanol gibi polar ve suyla karışabilen bir çözücü içinde çözülmetedir. Çözelti daha sonra kontrollü bir şekilde (damla damla şeklinde) sürfaktan içeren bir çözeltiye eklenmektedir. Nanopartiküller hızlı solvent difüzyonu ile anında oluşmaktadır. Son olarak, çözücü basınç altında rotavaporda veya gece boyu bekleyerek uçurulmaktadır. Önemli parametreler şunlardır: polimer / yüzey aktif madde oranı, polimer konsantrasyonu, yüzey aktif maddenin yapı ve konsantrasyonu, çözücü yapısı, viskozite, katkı maddeleri, aktif bileşen ve faz enjeksiyonu.

Her hazırlama yönteminin avantajları ve dezavantajları vardır, ancak en önemli hazırlama seçim kriterleri etkin maddenin kimyasal özellikleri, organik çözücüler, polimer ve yüzey etkin madde ile etkileşimlerdir. PLGA NPLerin hazırlamak için organik çözücünün difüzyonuna dayanan yöntemlerde NP büyüklüğünü 200 nm'nin altında tutmak için düşük polimer konsantrasyonu kullanmak gerekmektedir. Solvan buharlaşma aşamasını içeren yöntemler ise daha fazla zaman alıcı ve daha pahalıdır, ancak polimer konsantrasyonu miktarına daha az duyarlıdır. Özellikle emülsiyon

buharlaştırması yönteminin bir avantajı, hem hidrofilik (su /yağ/ su emülsiyon) hem de hidrofobik (su / yağ emülsiyon) ilaçların yüklenmesi için kullanılabilmesidir. Tuzların uzaklaştırması yöntemi, daha yüksek polimer konsantrasyonunda NP hazırlamak için uygundur, ancak saflaştırma işlemi bu yönteminin en önemli sınırlayıcı faktörüdür. NPlerin hazırlanması için bahsedilen tüm hazırlama yöntemlerimde, yüzey etkin madde konsantrasyonu, polimer konsantrasyonu, polimer moleküler ağırlığı, çözücü tipi ve organik/su faz oranları partiküllerin boyutunun kontrolünde önemli bir rol oynamaktadırlar. Bu parametreler optimize edilerek NPlerin in vitro ve in vivo özelliklerinin iyileştirmesi sağlanabilmektedir.

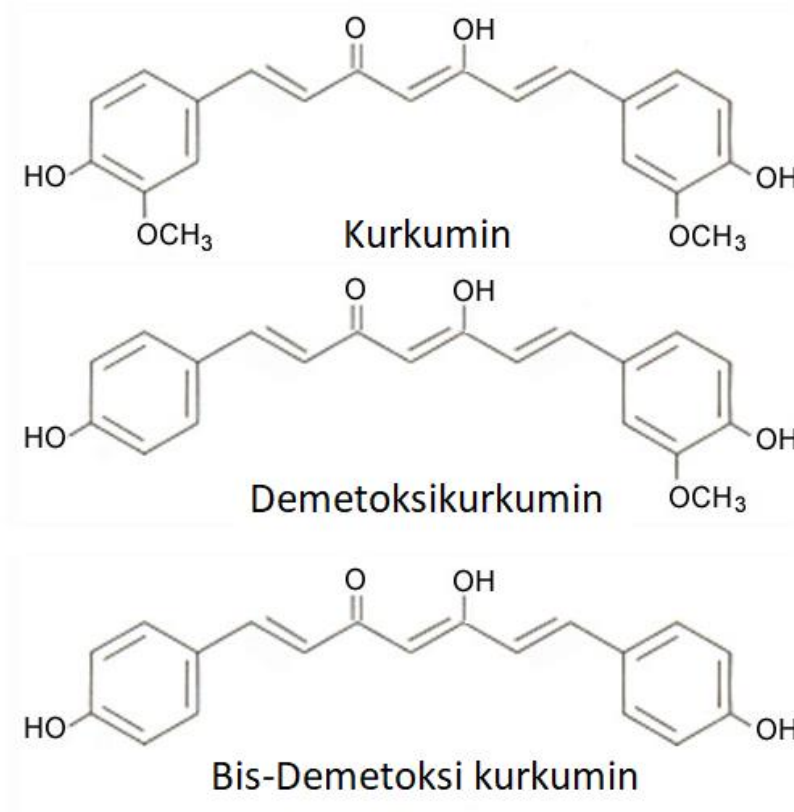
## 2.2.2. PLGA Bazlı Piyasa Preparatları

**Tablo 2.1.** PLGA bazlı piyasa preparatları

Ürün	Etkin Madde	Dosaj Şekli	Endikasyon	Üretici
Zoladex	Goserelin	Katı İmplant	Prostat Kanseri	AstraZeneca
Lupron Depot	Leuprolide	Mikropartikül	Prostat Kanseri	Sanofi Aventis
Sandostatin	Octreotide	Mikropartikül	Akromegali	Novartis
Atridox	Doxycycline	In situ jel	Periyodontitis	DenMat
Nutropin	Somatotropin	Mikropartikül	Gelişme Geriliği	Genentech, Inc
Trelstar	Triptorelin	Mikropartikül	Prostat Kanseri	Watson Pharma, Inc.
Superfact	Buserelin	Solid implant	Prostat Kanseri	Sanofi Aventis
Somatuline	Lanreotide	Mikropartikül	Akromegali	Ipsen
Arestin	Minocycline	Mikropartikül	Periyodontitis	OraPharma
Eligard	Leuprolide	In situ jel	Prostat Kanseri	Sanofi Aventis
RisperidalConsta	Risperidone	Mikropartikül	Antipsikotik	Janssen Pharmaceuticals
Vivitrol	Naltrexone	Mikropartikül	Opioid Bağımlılığı	Alkermes, Inc
Ozurdex	Dexamethasone	Katı İmplant	Macular edema	Allergan
Propel	Mometasone	Katı İmplant	Kronik Sinüsit	Intersect ENT
Bydureon	Exenatide	Mikropartikül	Tip 2 Diyabet	AstraZeneca
Lupaneta Pack	Leuprolide	Mikropartikül	Endometriosis	Abbvie
Gliadel	Karmustin	<i>Polymeric Wafer</i>	Glioma	Eisai Inc

### 2.3.Kurkumin

Kurkumin, zerdeçal baharatının temel bileşenidir ve Doğu Hint bitkisi *Curcuma longa* bitkinin rizomasından elde edilmektedir. *Curcuma longa*, Zingiberaceae (zencefil) botanik ailesinin bir üyesidir ve Güneydoğu Asya'ya özgü bir bitkidir (68). Zerdeçal, kurkuminoids olarak bilinen, kurkumin, demetoksikurkumin ve bisdemetoksikurkumin'den oluşan bir sınıf bileşik içermektedir (Şekil 2.5.) (69).



Şekil 2.5. Zerdeçal rizomasında bulunan kurkuminoid bileşikler (70)

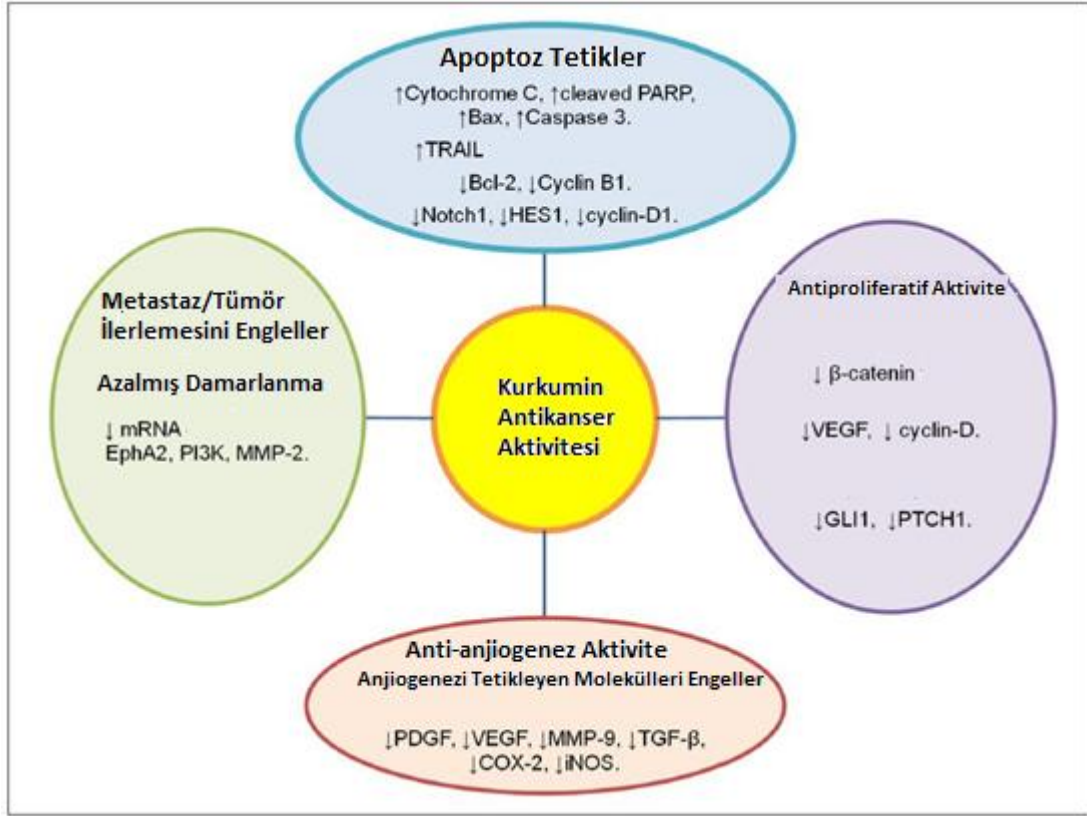
Kurkumin [1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione], asıl kurkuminoid bileşiğidir ve zerdeçalın yaklaşık % 2-5'ini oluşturmaktadır. Zerdeçalın

terapötik etkilerinin yanı sıra baharatın sarı renginden de sorumludur (68). Kurkumin, yüzyıllarca bir diyet takviyesi olarak tüketilmekte ve farmakolojik olarak güvenli kabul edilmektedir (71). Kurkumin, beyin, melanoma, baş ve boyun, meme, kolon, pankreas, prostat ve over kanserleri dahil olmak üzere birçok insan kanser türünde etiliği olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (72-77). Hindistan'da yapılan epidemiyolojik çalışmalarda kolon kanserinin görülme sıklığının düşük olması, , yüksek oranda kullanılmasına bağlı olarak, kurkuminin kemopreventif ve antioksidan özelliklerine bağlamaktadır (78). Kurkuminin antikanser etkinliği, hücresel büyüme ve apoptozis süreçlerindeki birçok mekanizmaya bağlı olduğu düşünülmektedir. Hücre büyümesini düzenleyici siklus üzerindeki çoklu kurkumin hedefleri (Şekil 2.6.) nedeniyle, birçok kanser için potansiyel bir kemoterapötik madde olarak büyük umut vaad etmektedir.

Kurkuminin glioma hücreleri üzerindeki *in vitro* ve *in vivo* etkileri iyi bilinmektedir. Kurkumin birçok moleküler hedefe ve dolayısıyla çeşitli ve karmaşık etki mekanizmalarına sahiptir. Kurkuminin antitümoral etkilerinin, hücresel proliferasyon (79-81), apoptoz (79, 80, 82), otofaji (83-85), anjiyogenez (86-88), immünomodülasyon (89), yayılma (82, 90, 91) ve metastaz (92-94) gibi birçok farklı sinyalleme yolu ile etki ettiği düşünülmektedir.

U87 insan glioma hücre hattını kullanan *in vitro* bir çalışmada, 5-10  $\mu$ M kurkuminin proliferasyonu inhibe ettiği ve G2 / M safhasında DUSP-2 ekspresyonu ve ERK ve JNK fosforilasyonunun inhibisyonu ile hücre çoğalmasını durduğu gösterilmiştir (95, 96). İlginç bir şekilde, G2 / M fazındaki hücre çoğalmasını durdurması radyasyona duyarlılıklarını arttırmaktadır. 100 nM kurkumin eklenmiş hücreler, radyasyona bağlı NF- $\kappa$ B'yi inhibe etmekte, radyasyona bağlı kaspaz aktivasyonunu arttırmakta ve antiapoptotik molekülleri inhibe etmektedir (97).





**Şekil 2.6.** Kurkuminin çeşitli anti-kanser özelliklerini gösteren akış şeması. VEGF: vasküler endotel büyüme faktörü; MMP: matris metaloproteinaz; PDGF: trombosit kaynaklı büyüme faktörü; TGF: dönüşüm büyüme faktörü; COX: siklooksijenaz; İNOS: indüklenebilir nitrik oksit sentaz; EpCAM: epitel hücre adezyon molekülü (98).

İnsan GBM (A172, KNS60, U251MG (KO)) ve medulloblastoma (ONS76) hücre hatları kullanılarak yapılan bir in vitro çalışmada, kurkuminin bu hücre hatlarının büyümesini önleyebildiğini, ancak sadece KNS60 ve ONS76'nın G2 / M'de durduğunu gösterilmiştir. Bu bulgular büyüme inhibisyonu mekanizmasının sadece hücre döngüsünün durmasından kaynaklanmadığını göstermektedir. Ayrıca, kaspaz 3/7 aktivitesinde, kurkumin kaynaklı DNA hasarında önemli bir artış ve BAX'ın aşırı eksprese edilmesi, Bcl2 ve survivinin aşağı regüle edici ve ayrıca hTERT'nin aşağı regülasyonu ve telomerazın inhibe edilmesinde tetiklenen apoptoz bulunmuştur (99).

Otofaji, gereksiz ya da işlevsiz hücresel bileşenlerin arındırılmasına yönelik hücresel bir işlemdir ve besinsel stres durumlarında ve programlanmış hücre ölümü sırasında enerjiyi korumak için gereklidir. 2012 yılında yayınlanan bir in vitro çalışmada,

kurkuminin, otofajiyi aktive ederek cerrahi müdahale ile alınmış insan GBM'sinden farklılaşmaya neden olabileceği ve glioma başlatan hücrelerin (SU-2 ve SU-3) büyümesini durdurabileceği gösterilmiştir (84).

Hücre dışı matris proteinlerini sindirmek için kullanılan matris metaloproteinazlarının (MMP'ler) anormal ekspresyonu, glioma hücrelerinin normal beyin dokusuna nüfuz etmek için kullandıkları bir yöntemdir. Veriler, kurkuminin, U87MG ve U373MG GBM hücre hatlarında MMP-1, MMP-3, MMP-9 ve MMP-14 ekspresyonunu baskılayabildiğini göstermiştir (90, 91, 100).

Ayrıca veriler kurkuminin, beyin tümörlerinin tedavisi için önceden onaylanmış kemoterapötiklerle sinerjistik olarak etki ettiğini belirtmektedir. Preklinik bir çalışmada, *in vitro* ve *in vivo* olarak GBM'nin tedavisi için kurkuminin etkinliği incelenmiştir (101). U138MG, U87, U373 ve C6 hücre hatları kurkumin ile muamele edilerek ve sırasıyla 29, 19, 21 ve 25  $\mu\text{M}$  IC50 değerlerine sahip olduğu bulunmuştur. Kemoterapi sinerjizmi daha sonra U138 ve C6 hücre hatları kullanılarak test edilmiştir. Tek başına kurkuminin sırasıyla %55 ve %75 hücre canlılığı gösterdiği bulunmuştur. Sisplatin, 25  $\mu\text{M}$  kurkumin ile kombinasyon halinde eklendiğinde, canlılık, U138 ve C6 hücre hatları için sırasıyla %30 ve %10'a düştüğü gözlemlenmiştir. Kurkumin, GBM tedavisi için paklitaksel (PTX) ile kombine etkinliğide araştırılmıştır. 20  $\mu\text{M}$  kurkumin ve 10 nM PTX ile muamele edilmiş ve LN18 ve U138MG hücre hatlarında yüksek sinerjik etki gösterdiği bulunmuştur. (102).

### **2.3.1. Kurkuminin Farmakokinetik Özellikleri**

Kemirgenlerde kurkumin emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımı, son otuz yılda birçok çalışmada araştırılmıştır. Genel olarak, bu çalışmalar organizma içinde kurkuminin ana bileşiğin miktarını ciddi şekilde azaltan, hızlı ve etkili bir metabolizmaya maruz kaldığını desteklemektedir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, sıçanlara uygulanan kurkumin dozu (1 g/kg), dışkıda kurkumin ile ilişkili bileşiklerin yaklaşık %75'ine neden olurken idrardaki miktarı ihmal edilebilir düzeyde olduğu ortaya çıkmıştır (103). Kurkuminoidlerin oral biyoyararlanımı düşüktür. Hidrofobik

olmaları ve dolayısıyla kimüs içindeki zayıf çözünürlükleri, fizyolojik ve alkali pH'taki düşük stabiliteleri (104) nedeniyle uygulanmış kurkuminoitlerin sadece küçük bir kısmı emilmektedir. Bağırsakta ve karaciğerde, kurkuminoidler di-, tetra-, heksa ve oktahidrokurkuminoidlere indirgenerek hızlı metabolizmaya maruz kalmaktadırlar. İndirgenmiş metabolitler, ağırlıklı olarak glukuronik asit ile ve daha az oranda, safra ve idrarla atılmalarını kolaylaştıran hidrofilik türevlere sülfatla konjuge edilmektedirler (105-107). Sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada, oral kurkumin uygulaması sonrası (500 mg/kg) sıçan plazmasında %1 oranında kurkumin biyoyararlanımı olduğu görülmüştür (108). Kurkuminoidlerin biyoyararlanımı ayrıca, enterositlerin luminal membranındaki taşıyıcı proteinlerinin aktivitesi nedeniyle sınırlıdır. Sıçanlarda ve insanlarda ağızdan alınan kurkumin sadece ihmal edilebilir miktarda idrar metabolitleri olarak atılırken (109, 110), çoğunluğu feçes ile değişmeden elimine edilmektedir (109).

Kurkumini güvenlik açısından değerlendirmek gerekirse oral olarak yüksek dozlarda bile tolere edilmektedir. Vadhan-Raj ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, asemptomatik, relaps veya plato faz multipl miyelomlu 29 hastada kurkuminin güvenliği, tolere edilebilirliği ve klinik etkinliği değerlendirilmiştir. Kurkumin 12 hafta boyunca (oral olarak 2, 4, 6, 8 veya 12 g/gün, iki bölünmüş dozda) verilmiştir. Kurkumin, önemli yan etkileri olmadan iyi tolere edilmiştir (111).

### 2.3.2. Kurkumin ile Onkoloji Alanında Yapılan Klinik Çalışmalar

Kurkuminin birçok kanser türünün tedavisi için klinik çalışmaları bulunmaktadır. Son yıllarda kurkumin ile yapılan klinik çalışmalar Tablo 2.2’de sıralanmıştır. Bütün veriler <https://clinicaltrials.gov> internet sayfasından alınmıştır. ClinicalTrials.gov, dünya çapında yürütülen özel ve kamu tarafından finanse edilen klinik çalışmaların bir veritabanıdır ve ABD Ulusal Tıp Kütüphanesi tarafından sağlanmaktadır.

**Tablo 2.2.** Kanser ile ilgili kurkumin güncel klinik çalışmalar

<b>Kanser Tipi</b>	<b>Faz</b>	<b>Yıl</b>	<b>Açıklama</b>
Kolorektal Kanseri	Faz 1	2011-2013	Kurkumin Biyomarker
Prostat Kanseri	N/A	2007-2015	Kemoprotektif Özellikler
Prostat Kanseri	Faz 3	2018-devam ediyor	Düşük Riskli Prostat Kanserinin İlerlemesini Önlemek
Prostat Kanseri	N/A	2013-2015	Kurkuminin Radyoduyarlık Arttırıcı ve Radyoprotektif Etkileri
Akciğer Kanseri	Faz 1	2014-2015	EGFR-Mutant Gelişmiş akciğer kanseri için kurkumin artı Tirozin Kinaz İnhibitörleri (TKI)
Kolon Kanseri	Faz 1	2011-2017	Bitki Ekzozomlarının Kurkumini Normal ve Kolon Kanseri Dokularına Taşıma Etkinliği
Myeloma	N/A	2005-2011	Multipl Miyelomlu Hastalarda Kurkumin
Pankreas Kanseri	Faz 2	2005-2010	Gemsitabin+Kurkumin Pankreas Kanseri Tedavisinde Etkinlik

**Tablo 2.2. (Devam)** Kanser ile ilgili kurkumin güncel klinik çalışmalar

<b>Kanser Tipi</b>	<b>Faz</b>	<b>Yıl</b>	<b>Açıklama</b>
İleri Katı Kanser	Faz 1	2012-Devam ediyor	İlerlemiş Katı Kanser Hastalara Kurkumin, Vorinostat Ve Sorafenib Kombinasyonunun Tolere Edilebilecek En Yüksek Dozunu Belirlemek.
Kolorektal Kanser	Faz 2	2015-2019	Kolorektal Kanserli Hastalarda Kurkumin ile Birlikte Kombinasyonda Avastin / FOLFIRI.
T-hücre Lemfoma	Faz 2	2009-2012	Kutanöz T hücreli Lenfoma Hastalarında Kurkumin Etkinliği
Rahim Ağzı Kanser	Faz 2	2016-devam ediyor	Prekanseroz Servikal Lezyonlar İçin Topikal Kurkumin
Meme Kanser	N/A	2019- devam ediyor	Meme Kanser Hastalarında Ameliyat Öncesi Kurkumin'in Etkisi
Glioblastoma	N/A	2012-2013	Glioblastoma Hastalarda Kurkuminin Biyoyaralanımı
Meme Kanser	Faz 2	2010-2012	Meme Kanser Hastalarında Radyasyona Bağlı Dermatitin Önlenmesinde Kurkuminin Etkinliği
Rahim Ağzı Kanser	Faz 1	2016-2017	Kurkuminin Skuamöz Servikal İntraepitelyal Neoplazilerin Tedavisinde Etkisi
Prostat Kanser	Faz 3	2014-2018	Radikal Prostatektomi Uygulanan Hastalarda Nüksüz Sağkalımı Değerlendirmek Adjuvan olan Kurkuminin Etkinliği
Meme Kanser	Faz 2	2017-devam ediyor	Gelişmiş Meme Kanseri Kemoterapi ile Kurkumin Kombinasyonu

**Tablo 2.2. (Devam)** Kanser ile ilgili kurkumin güncel klinik çalışmalar

<b>Kanser Tipi</b>	<b>Faz</b>	<b>Yıl</b>	<b>Açıklama</b>
Baş ve Boyun Kanseri	Faz 1	2010-2016	Baş Boyun Kanserinde Kurkumin Kemoprotektif olarak Biomarker Çalışması
Lösemi ve Lemfoma	N/A	2014-2019	Tedavi Edilmemiş Aşama 0-II Kronik Lenfositik Lösemi veya Küçük Lenfositik Lenfoma Hastaların Tedavisinde Kurkumin Etkinliği
Katı Kanserler	Faz 1	2013-devam ediyor	Kurkumin'in Katı Tümörlü Hastalarda İrinotekanın Doz Sınırlayıcı Toksisitesi ve Farmakokinetiği Üzerine Etkisi
Kolorektal Kanseri	Faz 1	2009-2014	Kolorektal Endoskopi veya Kolorektal Cerrahi Uygulanan Hastalarda Kolorektal Kanseri Önlemede Kurkuminin Etkinliği
Metastatik Kolon Kanseri	Faz 3	2006-2007	Metastatik Kolon Kanseri Hastalarda Faz III Gempitabin, Kurkumin ve Celebrex Çalışması
Rektal Kanseri	Faz 2	2008-devam ediyor	Rektal Kanseri Hastaların Tedavisinde Cerrahi Öncesi Kurkumin Olan veya Olmayan Kapsitabin Tedavi Etkinliği
Meme Kanseri	Faz 2	2012-2018	Radyoterapi Tedaviye Devam Eden Kemoterapi ile Tedavi Edilmiş Meme Kanseri Hastalarında Kurkumin ve Plasebo Çalışması
Kolon Kanseri	Faz 1	2003-2012	Kolon Kanserin Önlenmesinde Kurkuminin Etkinliği

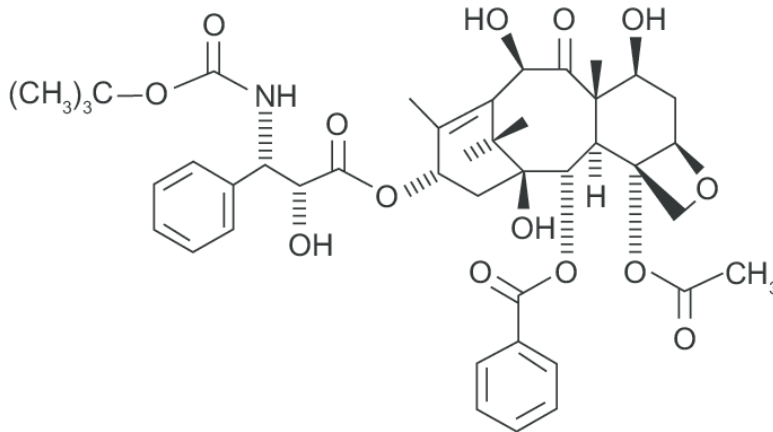
**Tablo 2.2. (Devam)** Kanser ile ilgili kurkumin güncel klinik çalışmalar

<b>Kanser Tipi</b>	<b>Faz</b>	<b>Yıl</b>	<b>Açıklama</b>
Gastrik Kanser	Faz 2	2016-devam ediyor	Kronik Atrofik Gastrit veya Gastrik İntestinal Metaplazi Hastalarında Mide Kanserin Önlenmesinde Kurkumin Etkinliği
Prostat Kanser	Faz 2	2014-2018	Prostat Kanser Metastatik Kastrasyonuna Dirençli Tedavisinde Taxotere + Curcumin (CURTAXEL) ve Taxotere + Plasebo Kombinasyonunun Çok Merkezli Karşılaştırma Çalışması
İleri Kanser	Faz 1 ve 2	2014-devam ediyor	Kanser Hastalarda Faz IB Lipocurc Doz Yükselme Çalışması
Prostat Kanser	Faz 2	2016-devam ediyor	Radyoterapi (RT) Alan Prostat Kanser Hastaları için Nanocurcumin Etkinliği
Kolon Kanser	Faz 1	2016-devam ediyor	5FU+Kurkumin Kolon Kanser Tedavisinde Etkinlik
Kemik Kanser	Faz 1	2008-2011	Kurkumin Formülasyonu Gelişmiş Osteosarkomun Pilot Çalışması (OSCAT)

## 2.4.Dosetaksel

Paklitaksel ile benzer yapıda olan dosetaksel (DTX) *Texas baccata*'nın kabuğundan izole edilen karmaşık bir diterpen alkaloiddir (Şekil 2.7.). Dosetakselin, etki mekanizması, yan etkiler ve direnç mekanizmaları bakımından paklitakसेle benzerdir. Bununla birlikte, dosetaksel paklitakselden suda çözünürlüğü ve hedef bölgesindeki afinitesi paklitakसेle göre daha yüksektir. DTX tubuline daha güçlü bağlanmasından dolayı, tümör hücreleri üzerinde paklitakसेle göre 2 ila 4 kat daha fazla sitotoksite göstermektedir (112). Ek olarak, dosetaksel ile tedavi edilen hastaların %5'inden daha azında aşırı duyarlılık reaksiyonları ortaya çıkmakta ve daha az nöropati gözlenmektedir. Dosetaksel, meme, akciğer, baş ve boyun, mide, yumurtalık, mesane ve beyin kanserlerinin tedavisinde etkilidir (113). Gliomanın in vitro tedavisinde etkili olduğu bulunmuştur ancak sudaki düşük çözünürlüğü, yüksek moleküler ağırlığı ve kan-beyin bariyeri nedeniyle in vivo etkinliği düşüktür (114-116).

Antikanser etki mekanizması iyi bilinmektedir. DTX tübülüne bağlanarak stabilize etmesi sonucu, fizyolojik mikrotübül depolimerizasyonunu ve ayırmasını önleyerek G2/M fazında hücre döngüsünü durdurmakta ve hücre ölümüne yol açmaktadır. DTX ayrıca antiapoptotik gen Bcl2 ekspresyonunu inhibe etmekte ve hücre döngüsü inhibitörü p27'nin ekspresyonunu desteklemektedir (117-119).



Şekil 2.7. Dosetaksel kimyasal yapısı (120)



DTX de diğ er taksenla r gibi, gastrointestinal sistemde zayıf bir oral absorpsiyona sahiptir (121) ve piyasadaki DTX'in tek dozaj şekli enjeksiyon şeklindedir (*Taxotere*). DTX'in zayıf oral biyoyararlanımının ana nedenleri, DTX'in suda çözünlüğüne düşük olması, çoklu ilaç direnci (MDR) pompası P-glikoproteine (P-gp) ve hepatik ilk geçiş metabolizmasına yüksek afinitesidir (122, 123). Monoterapi olarak oral yolla verilen dosetaksel % 10'dan daha düşük oranda biyoyararlanıma sahiptir (121). DTX'in (*Taxotere*) pazarlanan formülasyonu, 50:50 oranında polisorbitat 80:susuz etanol karışımından oluşan bir çözünlük artırıcı çözeltili içermektedir. İçindeki polisorbitat 80, şiddetli aşırı duyarlılık reaksiyonları, anafilaksi, hiperlipidemi, anormal lipoprotein düzenleri ve eritrositlerin agregasyonu gibi bazı olumsuz etkilerden sorumludur (124). Bu problemleri aşmak için lipozomlar (125, 126), emülsiyonlar (127, 128), polimerik nanopartiküller (129, 130) gibi ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması ve siklosporin A (131, 132) gibi bir P-gp / P450 inhibitörünün uygulanması gibi çeşitli yöntemler önerilmiştir.

#### 2.4.1. Dosetakselin Farmakokinetik Özellikleri

İntravenöz dosetaksel'in farmakokinetik özellikleri, 20-115 mg / m<sup>2</sup> dozlarında kemoterapi tedavisi alan kanser hastalarında değerlendirilmiştir (133, 134). Farmakokinetik profil üç kompartman model ile uyumlu olup yarı ömürleri 4 dakika, 36 dakika ve 11,1 saattir (133, 134). İntravenöz olarak 70-115 mg / m<sup>2</sup> dozlarda verilen dosetaksel, uygulanmasından sonra 1-2 saat içinde lineer kinetik göstermektedir (134). Dosetaksel dozunun % 95'inden fazlası plazma proteinlere bağlanmaktadır (133, 134). Dosetaksel, sitokrom P450 (CYP) 3A4 izoenzimi tarafından metabolize edilmektedir. DTX Metabolizasyonu, CYP3A4 enzimini indükleyen, inhibe eden veya CYP3A4 enzimi ile metabolize edilen ajanlar ile birlikte verilmesinden etkilenmektedir (134). Dosetaksel esas olarak dışkı yoluyla elimine edilmektedir. <sup>14</sup>C-doksetaksel uygulaması sonrasındaki 7 gün içerisinde, dışkı ve idrar atılımı, uygulanan radyoaktivitenin sırasıyla % 75 ve % 6'sını oluşturmuştur (133, 134). Kişiler arasında farmakokinetik özellikler değişkenlik göstermektedir.

## 2.5.Tümörlere İlaç Taşımadaki Engeller

Çoğu kemoterapötik ilaç, sistemik enjeksiyon yoluyla verilir ve tümör bölgesine ulaşmadan önce kan dolaşımında dolaşmaktadır. IV olarak sitotoksik ilaçların uygulamasının bir dezavantajı, maddenin hem sağlıklı doku hem de tümör ile temas etmesidir. Sağlıklı doku ve kemoterapötik ajan arasındaki bu etkileşim, sıklıkla tedaviye eşlik eden zayıflatıcı yan etkilere neden olmaktadır. Sistemik ilaç taşımada başka bir başka dezavantaj, ajanın tümör bölgesine ulaşmadan önce çok sayıda hücre dışı ve hücre içi engellerle karşılaşmasıdır. Ayrıca, ilacın biyolojik aktivitesini koruması ve terapötik etkinliğe sahip olması için yeterince yüksek konsantrasyonlarda hedef bölgeye ulaşması gerekmektedir.

### 2.5.1 Retiküloendotelyal Sistem ve Mononükleer Fagositik Sistem

Mononükleer fagositik sistem (MPS) olarak da bilinen retiküloendotelyal sistem (RES), birincil işlevi, bakteriler gibi yabancı cisimlerini vücuttan arındırmak olan bir grup organ ve dolaşımdaki makrofajlardır (135). Kan dolaşımına giren nanopartiküller de aynı zamanda RES / MPS tarafından hızlı klirensine maruz kalmaktadır. Bu yabancı cisimler, tipik olarak karaciğer makrofajları veya Kupffer hücreleri tarafından doğrudan tanınmaz ve önce opsonizasyon adı verilen bir işlemde bir protein tabakasıyla kaplanmaktadır. Bu sürece dahil olan proteinler, dolaşımda bulunan bir protein sınıfı olan opsoninler olarak adlandırılmaktadır. Bu proteinler, yabancı bir partikül ile karşılaştıklarında, iyonik, elektrostatik, hidrofobik, hidrofilik ve van der Waals kuvvetleri gibi çeşitli etkileşimlerle bağlanmaktadır (135). Makrofajlar daha sonra yabancı cisme bağlanmış opsonin proteinlerinin yüzey tabakasını tanımlar ve partikülü fagositoz ile yutmaya devam ederler ve ardından lizozom gibi hücre içi kesecikler içinde parçalara ayırmaktadır (136).

### 2.5.2 İlk Geçiş Renal Filtreleme

İnsan vücudu, yabancı parçacıkları tanıma ve dolaşımdan çıkarma konusunda özellikle tasarlanmış bir sistemdir. Renal sistemi kanın saflaştırılmasında önemli bir bileşendir ve ilaç taşıyıcı sistem tasarlanırken önemli bir husustur. Böbrekler, glomerüler kılcal duvar olarak bilinen bir yapıdan kanı filtre etmektedir. Çapı 10 nm'den az olan partiküller, bu yapı boyunca renal filtrelemeye tabi tutulmaktadır (137, 138).

### 2.5.3 Heterojen Kan Akımı

Tümör dokusunun hızlı çoğalması nedeniyle, tümör vaskülatürü oldukça anormal ve düzensizdir. Düzensiz vaskülatür yapısı ile bağlantılı olarak sinir ve düz kas eksikliği heterojen kan akışına yol açmaktadır. Buda, makromoleküler terapötik ajan tümör dokusu boyunca eşit olarak dağılmayacağından, sistemik ilaç uygulamasına bir engel oluşturmaktadır (139). Zayıf kan akışına sahip tümör dokusu olanların genellikle tedaviye dirençli olduğu gösterilmiştir (140).

### 2.5.4 Yüksek Tümör İnterstisyel Basıncı

Tümör interstisyumu, tümör kitlesinin çoğunu oluşturur ve kollajen ve yüksek derecede viskoz bir sıvıdan oluşmaktadır (141). İnterstisyum içindeki sıvının, tümör boyutu ve tümör merkezine yakınlığı ile artan bir basıncı vardır. Bu basınç artışı, sınırlı bir alanda hızlı hücrel proliferasyon, interstisyum içine yüksek vasküler geçirgenlik ve interstisyumdan lenfatik drenaj olmaması gibi faktörlerin birleşiminden kaynaklanmaktadır (142, 143). Basınç arttıkça interstisyuma ilaç difüzyonu azalmaktadır. Bu nedenle, interstisyel basıncın en yüksek olduğu tümör kütlesinin merkezinde ilaç birikiminde azalma eğilimi vardır (141).

### 2.5.5 Ekstrasellüler Matriks (ECM)

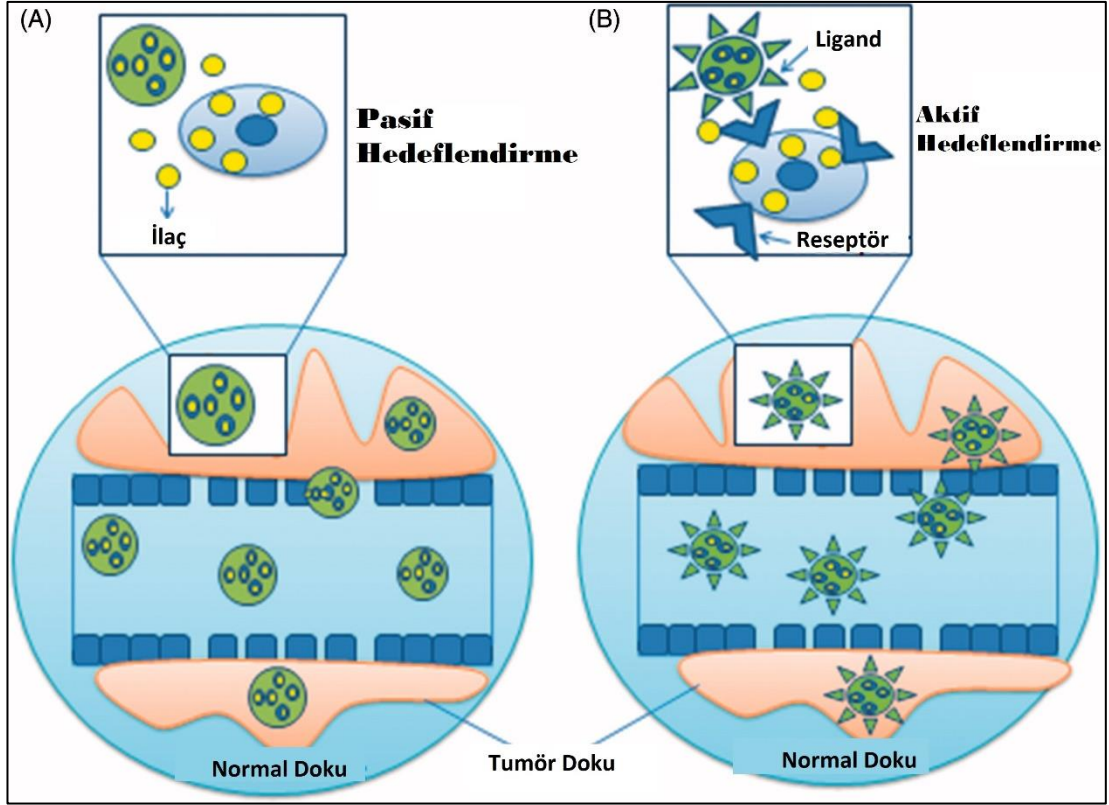
Hücre dışı matriks, yüksek derecede viskoz bir polisakkarit içeren sıvının yanı sıra kollajen ve elastin gibi lifli proteinlerden oluşmaktadır. Birincil işlevleri hücrel yapı ve bütünlüğü korumak, komşu hücreler dahil olmak üzere dış çevre ile hücrel etkileşimi modüle etmek, makromoleküler transportu düzenlemek ve bakteriyel infiltrasyona karşı bir bariyer görevi yapmaktır. İlaç taşıma ve daha spesifik olarak kemoterapötik ajan taşıma bağlamında ECM, zor bir fiziksel bariyer oluşturmaktadır. Hyaluronan ve proteoglikan içeren, sıkı lifli proteinler ve yüksek viskoz ECM sıvısı, tümör interstisyumu içindeki ilaç moleküllerinin yayılma ve uzaysal dağılımını azaltmaya neden olmaktadır (139, 142).

### 2.5.6 Hücre İçi Girişi

İlaç bileşeni hücreye ulaştığında, hücre içerisine girmelidir. Bu hücre içine giriş süreci fagositoz veya hücre yutma olarak adlandırılır ve bir partikülü çevreleyen ve yutmuş olan hücrel membranın aktin uzantılarından oluşmaktadır (136). Partikül, sitoplazma boyunca taşınmak için hücre içi kesecik içinde yer almaktadır. Partikül erken endozomdan geç endozoma ve nihayet degradasyon için lizozoma götürülmektedir. Bu yol boyunca pH, 7.4'ten yaklaşık 5.0'a düşmektedir. Ek olarak, hücre içi bileşenler içinde yer alan yabancı cisim parçalamasına yardımcı olan enzimler bulunmaktadır. İlaç, aktivitesini hem düşük pH hem de yaygın enzimatik aktivite ortamında sürdürmelidir (136).

## 2.6 Hedeflendirme

İlaç yüklü nanopartiküllerin hedef bölgelere taşınması için üç ana yol vardır: pasif hedeflendirme, aktif hedeflendirme ve fiziksel hedeflendirme (şekil 2.8.).



**Şekil 2.8.** Pasif ve aktif ilaç hedeflendirme stratejiler kanser dokusu üzerinde farklılıklar (144).

### 2.6.1 Pasif Hedeflendirme

Pasif hedeflendirme, tümör hücrelerinin tercihen nanopartikül büyüklüğünde partikülleri absorbe etmesini sağlayan ‘Arttırılmış Geçirgenlik ve Alıkonma’ (EPR) etkisi ile hedeflendirme sağlamaktadır. Nanopartiküllerin pasif hedeflendirmesi, anormal tümör fizyolojisinden ve bunu sebebi olarak ortaya çıkan EPR etkisinden yararlanmaktadır. Lenfatik sistemden drenaj yetersizliği ve vaskülatürün geçirgenliği pasif olarak makromolekülleri biriktirebilir ve tümörde ilaç konsantrasyonunu 70 kat arttırabilmektedir (145). Tümör dokusunda ilaç birikimi, sadece makromoleküllerin, MPS / RES tarafından alımı ve böbrek klirensi gibi mekanizmalarla klirensi önlendiğinde gözlenecektir. Etkili nanotaşıyıcıların en önemli özelliklerinden ikisi, taşıyıcıların; (a) önemli miktarda bir süre boyunca kan akışında dolaşımında kalması ve

(b) spesifik doku ve hücreleri hedef almasıdır (145). Partikül kanda kalış süresi, hedeflendirme ve biyolojik engellerin üstesinden gelme yeteneği, bir partikülün şekline, boyutuna ve yüzey özelliklerine bağlıdır. Kan dolaşımında bir nanopartikülün ömrü çevreyle olan etkileşimine bağlıdır ve boyutu, partikül şekli ve yüzey karakteristiklerindeki farklılıklara bağlı olarak değiştirilebilmektedir (137).

EPR etkisine katılan nanopartiküllerin üst sınır büyüklüğünün yaklaşık 400 nm olduğu belirlenmiştir (146). 400 nm'den büyük maddeler, herhangi bir klinik veya terapötik etkiye sahip olacak kadar yeterli miktarlarda tümör interstisyumundan kolayca geçememektedir. Etkili bir ilaç taşıyıcı olabilmek için, nanopartikül 10-150 nm arasında bir çapa sahip olmalıdır. Bu boyut aralığı, daha uzun dolaşım süresine ve tümör interstisyumunda artmış birikim sağlayacaktır (147).

Pasif hedeflendirme, nanopartiküllerin boyut, şekil ve yüzey özelliklerinin uygun hale getirilmesi ile sağlanabilmektedir. Bununla birlikte, genellikle tümör bölgesinde yetersiz ilaç konsantrasyonuna bağlı olarak terapötik etkinliğin sınırlı olması, sadece pasif hedeflendirmesi bulunan ilaç taşıyıcı sistemler için önemli bir bariyer olarak kalmaya devam etmektedir. Tez kapsamında olan pasif hedeflendirme, sağlıklı dokuları tümör dokusundan aktif olarak ayırt edememe gibi geleneksel kemoterapinin aynı sınırlamalarını bulundurmaktadır.

## 2.7 Deney Tasarımı (*Design of Experiment*)

Yirminci yüzyılın başında, Sir Ronald Fisher, istatistiksel analiz kavramını deney bitiminde değil, aksine araştırmanın planlanması aşamasında uygulanması gerektiğini vurgulamıştır. İstatistiksel düşünme tasarım aşamasında uygulandığında, ürüne kalite kazandırılmasını sağlamaktadır. İlaç endüstrisi satış rekorları kıran ilaçlara odaklanırken, formülasyon geliştirme sırasında Tasarımla Kalite (QbD) ve modern mühendislik temelli üretim metodolojilerini uygulamak yerine, her bir deneyde bir faktör (One Factor At a Time, *OFAT*) çalışmalarına yönelmektedir.

Deney tasarımı (DOE) yaklaşımında süreç değişkenlerinden hangisinin sonuç için önemli olduğunu belirlemekle başlar. İkinci adım, önemli değişkenler için en iyi

değerlerin belirlendiği 'optimizasyondur'. Karışım içeriğini değiştirmek ve bu değişikliklerin nasıl değiştiğini araştırmak için deney tasarımı kullanılmaktadır. Box-Behnken tasarımı, gıda ve ilaç araştırmalarında koşullarını optimize etmek için başarılı bir şekilde uygulandığı bilinmektedir.

### **2.7.1. Box-Behnken Tasarımı**

Günümüzde, istatistiksel deneysel tasarımı uygulanmasının, formülasyondaki bağımsız ve bağımlı değişkenler arasındaki ilişki hakkında bilgilerin iyi anlaşılmasında etkili olduğu kabul edilmiştir (148-150). Box-Behnken, gıda ve ilaç araştırmalarında koşulları optimize etmek için başarılı bir şekilde uygulanabildiği gösterilmiştir (151-154). Tepki yüzey Yöntemi (*Response Surface Methodology*, RSM), istatistiksel ve matematiksel tekniklerden oluşan bir süreçtir ve prosesi optimize etmek için etkili bir araçtır (155). Bir RSM tasarımı olan Box-Behnken tasarımı, 3 faktörlü bir deneysel tasarımda diğer tüm RSM tasarımlarından daha az çalışma yapma imkanı sunmaktadır. Box-Behnken, optimum nanopartikül formülasyonunun elde edilebileceği, karakterizasyon sonuçları üzerindeki farklı faktörlerin doğrusal ve etkileşimli etkilerini araştırmak için kullanılmaktadır (156, 157).

**Tablo 2.3.** Üç düzey ve üç faktörlü bir Box-Behnken tasarım matrisi. Pozitif değerler faktörlerin yüksek düzeylerini, negatif değerler faktörlerin düşük düzeyini, sıfır değeri ise faktörler için orta düzeyi ifade etmektedir.

Deney	Faktörler		
	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	-	-	0
2	+	-	0
3	-	+	0
4	+	+	0
5	-	0	-
6	+	0	-
7	-	0	+
8	+	0	+
9	0	-	-
10	0	+	-
11	0	-	+
12	0	+	+
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

## 2.8 Nanopartikül Kritik Parametreleri

### 2.8.1 Partikül Büyüklüğü

Nanopartiküllerin büyüklüğü, çevresi ile etkileşimi üzerinde son derece önemli bir etkiye sahiptir. Bir partikül ilk geçiş renal filtrasyonu ile temizlenmeyi önlemek için en az 10 nm çapında olmalıdır (137, 138). Pasif hedeflendirme tamamen tümöre difüzyon aracılı transporta bağlı olduğundan, partikül büyüklüğü önemlidir. Model



makromolekül olarak dekstran kullanılan bir çalışmada, moleküler ağırlığı 3.3 kDa'dan 2 MDa'ya arttırmanın, geçirgenliği 100 kat azalttığı gösterilmiştir. Büyük moleküller, ancak tümör içindeki vasküler yüzeye yakın yerlerde birikim göstermiştir. Daha küçük moleküller tümör hücrelerarası bölgesinden daha derine nüfuz edebilir ve daha homojen bir dağılım sağlamaktadır (158). Makromoleküllerden nanopartiküllere ekstrapole edildiğinde, EPR etkisinden yararlanan nanopartiküllerin üst sınır büyüklüğünün yaklaşık 400 nm olduğu belirlenmiştir (146). 400 nm'den büyük maddeler, herhangi bir klinik veya terapötik etkiye sahip olacak kadar yeterli miktarlarda tümör interstisyumundan kolayca geçememektedir. EPR'nin etkisinden yararlanmak için 400 nm üst sınır olmasına rağmen, nanopartiküllerin etkili boyut aralığını daha küçük seviyelere düşüren diğer önemli faktörler vardır. Tümörlerde sızan vaskülatür, eksik veya anormal bazal membranların yanı sıra fenestrasyonların boyut ve miktarının artmasına bağlı olarak oldukça geçirgendir (141, 159). Yukarıda belirtilen faktörlerin tamamı dikkate alındığında, yaklaşık 150 nm'lik bir üst sınır belirlenmiştir (147). Bu nedenle, etkili bir ilaç taşıyıcı olabilmek için, nanopartikül 10-150 nm arasında bir çapa sahip olmalıdır. Bu boyut aralığı, daha uzun dolaşım süresini ve tümör interstisyumunda birikimi sağlayacaktır.

### 2.8.2 Partikül Yüzeyi

Nanopartiküllerin yüzeyi, çevresi ile etkileştiği birincil ortamıdır. Büyük yüzey-hacim oranları nedeniyle nanopartiküller için özellikle daha da önemlidir (160). Yüzey, polimer içeriği veya yüzey fonksiyonelleştirmesiyle modifiye edilebilmektedir. Tümör bölgesinde birikimi sağlamak için mümkün olan en uzun süre boyunca nanopartikülün dolaşımında kalması gerekmektedir. Hidrofilik polimerler ile nanopartiküllerin yüzeyinin modifiye edilmesi sonrasında, MPS / RES sistemi ile atılımın azadığı belirlenmiştir (16). Polisorbat 80 hidrofilik özellikte bir sürfaktandır. Nanopartiküllerin yüzeyi kaplandığında polisorbat 80, nanopartiküllerin opsonin adsorpsiyonundan ve MPS / RES tarafından uzaklaştırılmasından koruyarak nanopartiküle gizlilik (*Stealth*) özelliği kazandırmaktadır. Partikül dağılımını değiştirmek için kullanılan farklı sürfaktanlar arasında, polisorbat 80, polimerik

nanopartiküllerin beyine taşınmasında kullanılan en etkili sürfaktanlar arasındadır (161). Hekmatara ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, tümör modeli geliştirilen hayvanlara, doksorubisin çözeltisi (*Dox-sol*) ve doksorubisin yüklü polisorbitat 80 kaplı polimerik nanopartiküller (*Dox-np*) uygulanmıştır. *Dox-np*, *Dox-sol* ve tedavi edilmemiş kontrol grupları kıyaslandığında *dox-np* grubunda belirgin şekilde tümör boyutunda daha fazla küçülme görülmüştür (162).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Maddeler ve Ekipman

Tez çalışması kapsamında kullanılan tüm maddeler Tablo 3.1.'de, ekipmanlar ise Tablo 3.2.'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Tez çalışmasında kullanılan maddeler.

Madde	Marka
Dosetaksel	Koçak Farma
Kurkumin	İLKO Pharmaceuticals
Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) (laktik asit:glikolik asit oranı 50:50, asit ve ester terminal grupları, 7-17 kDa ve 24-38 kDa molekül ağırlıkları)	Sigma-Aldrich Co., ABD
Polivinil alkol (PVA)	Sigma-Aldrich Co., ABD
Polisorbat 80	Sigma-Aldrich Co., ABD
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolyum bromid (MTT)	Sigma-Aldrich Co., ABD
Asetonitril	Sigma-Aldrich Co., ABD
Asetik asit	Sigma-Aldrich Co., ABD
Fosfat tampon tuzu (PBS) tabletleri	Sigma-Aldrich Co., ABD
Fetal bovin serumu (FBS)	BioChrom AG, Almanya
Penisilin-Streptomisin	BioChrom AG, Almanya
Dulbecco's modifiye Eagle's ortamı (DMEM)	BioChrom AG, Almanya

Kullanılan bütün kimyasallar yüksek derecede saf veya kromatografik kalitesindedir.

**Tablo 3.2.** Tez çalışmasında kullanılan ekipman.

<b>Ekipman</b>	<b>Marka</b>	<b>Kurum</b>
Manyetik karıştırıcı	Ika Magnetic Stirrer, Almanya	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Ultrasonik Homojenizatör	Bandelin SONOPULS ultrasonic homogenizer, Almanya	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Santrifüj	Hermle Z 383 K, Almanya	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Liyofilizatör	Labconco Freeze Dryers, ABD	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)	Agilent UV 1200, ABD	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
İstatistik yazılımı	Minitab® 16, ABD	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektrometresi	Shimadzu IRPrestige-21, Japonya	İLKO Pharmaceuticals
Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçüm cihazı	Malvern Ins, Zetasizer Nanoseries-ZS, İngiltere	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Ultrasaf su düzeneđi	Millipore, Fransa	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
pH metre	Sartorius Professional Meter PP-20, Almanya	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Hassas Terazi	AX200 Shimadzu, Japonya	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Yatay Çalkalayıcılı Su Banyosu	Memmert, Almanya	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Laminar Akış Kabini	Biolab, BHG 2004-S,	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Floresan Mikroskop	Leica, Almanya	Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Hastanesi
Akım sitometri cihazı	FACSAria II, Becton Dickinson, ABD	Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Hastanesi
Spektrofotometrik plak okuyucu	Spectramax Plus, Molecular Devices, ABD	Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Hastanesi
CO <sub>2</sub> inkübatör	Thermo Scientific, HeraCell 150i, ABD	Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Hastanesi
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	FEI, ABD	ODTÜ Merkez Laboratuvarı, Ankara
Transmisyon Elektron Mikroskopi (TEM)	RTEM, 200KV, JEOL, ABD	ODTÜ Merkez Laboratuvarı, Ankara

### **3.2.Kurkumin ve Dosetaksel Miktar Tayini Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu**

PLGA Nanopartiküllere yüklenen kurkumin ve dosetaksel miktarını belirlemek için analitik yöntem geliştirilip valide edilmiştir (163). Kurkumin ve dosetaksel maddeleri için UV ve görünür bölgeleri spektrumları (200-800 nm arasında) alınarak en yüksek absorbansın gösterildiği bölge belirlenmiştir. Her iki etkin madde farklı spektrum ve maksimum absorbansları olduklarından iki farklı yöntem geliştirilmiştir. Kurkumin ekstresinde, kurkumin yanı sıra aynı zamanda kurkumine yapı olarak çok benzer demetoksikurkumin ve bisdemetoksikurkumin türevler bulunmaktadır. Bu üç madde de HPLC-UV kromatografik yöntemi ile başarılı bir şekilde ayrılmıştır.

#### **3.2.1. Kromatografik koşullar ve sistem**

Kurkumin ve dosetaksel için geliştirilen yöntem yüksek performans sıvı kromatografisi (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC)-UV ve görünür bölge (GB) deteksiyona dayanan bir yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Polisorbat 80 miktar tayini için ise UV spektrofotometri yöntemidir. HPLC-UV cihazı, 4 kanallı, otomatik pompa, otomatik örnekleyici, kolon termostatu ve UV-GB dedektörden oluşmaktadır. Her iki etkin maddenin kromatografik koşullar Tablo 3.3'de özetlenmiştir.

**Tablo 3.3.** Kurkumin ve dosetaksel miktar tayini yöntemin kromatografik koşullar

<b>Parametre</b>	<b>Kurkumin</b>	<b>Dosetaksel</b>
Kolon	Zorbax C18, Agilent 150x4.6 (ODS)	Zorbax C18, Agilent 150x4.6 (ODS)
Akış hızı (ml/s)	1.0	1.2
Kolon sıcaklığı	45 °C	45 °C
Dalga boyu (nm)	425	230
Analiz süresi	15 dk	10 dk
Enjeksiyon hacmi	10 µL	10 µL
Hareketli faz	Asetonitril:%5 Asetik Asit (40:60)	Asetonitril:Su (45:55)

Kullanılan yöntem izokratik kromatografik yöntemidir. Analize başlatılmadan öncelikle sadece hareketli faz ile cihazın temizlenmesi ve kolonun şartlanması için en az 30 dakika çalıştırılmıştır.

### 3.2.2. Stok ve Standart Çözeltilerin Hazırlanması

#### **Kurkumin**

1 mg kurkumin balon jöjeye hassas terazide tartılmış ve seyreltme çözeltisi (mobil faz ile aynı) ile hacmine tamamlanarak hazırlanmıştır (Stok çözeltisi, 1,000 µg/ml, n=3). Stok çözeltisi kullanılarak 1, 10, 20, 50, 100 ve 500 µg/ml konstrasyonlarda standart çözeltiler seyreltme çözeltisi ile doğru oranlarda seyreltilerek hazırlanmıştır. HPLC analizine başlamadan önce bütün çözeltiler 0,22 µm PTFE filtresi ile filtre edilmiştir.

## Dosetaksel

1 mg dosetaksel balon jöjeye hassas terazide tartılarak ve seyreltme çözeltilisi (mobil faz ile aynı) ile hacmine tamamlanmıştır (Stok çözeltilisi, 1,000 µg/ml, n=3). Stok çözeltilisi kullanılarak 1, 10, 20, 50 ve 100 µg/ml konstrasyonlarda standart çözeltiler seyreltme çözeltilisi ile doğru oranlarda seyreltilerek hazırlanmıştır. HPLC analizine başlamadan önce bütün çözeltiler 0,22 µm PTFE filtresi ile filtre edilmiştir.

### 3.2.3. Özgünlük

Geliştirilen analitik yöntemde analizi yapılacak maddeyi ortamda bulunan diğer maddelerden ayırt edebilme yeteneğini gösterebilmek için özgünlük testleri yapılmıştır. In vitro ilaç salımı ve formülasyonda yer alan diğer maddelerin kurkumin ve dosetaksel ile etkileşime girip girmediğini tayin edilmiştir. Bunun için hareketli faz, PLGA, PVA, PBS, PBS+Fetal Bovine Serum (FBS), 50 µg/ml kurkumin ve 50 µg/ml dosetaksel çözeltilerin her iki analitik yöntem ile analiz yapılmış ve elde edilen kromatogramlar karşılaştırılarak etkileşim olup olmadığına değerlendirilmiştir.

### 3.2.4. Doğrusallık ve Aralık

Geliştirilen analitik yöntemde, analitin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olan analitin verdiği pik alanının ilişkisini (*Correlation*) incelemek için yapılmıştır. Kurkumin için seçilen çözeltili konsantrasyonları 1, 10, 20, 50, 100 ve 500 µg/ml (n=3) ve dosetaksel için seçilen çözeltili konsantrasyonları 1, 10, 20, 50, 100 µg/ml (n=3) şeklindedir. Düşük konsantrasyonların dahil edilmesinin sebebi, in vitro ilaç salımı deneyinde ve enkapsülasyon etkinliği değerlendirilmesinde elde edilecek düşük ilaç miktarlarını tayin edebilmektir.



### 3.2.5. Doğruluk ve Kesinlik

Geliştirilen analitik yöntemde, analitin konsantrasyonun bir fonksiyonu olan analitin verdiği pik alanından elde edilen analit miktarı ve gerçek analit miktarı arasındaki fark (% geri elde) ve tekrarlanabilirliğini incelemek için yapılmıştır. Kurkumin için seçilen çözelti konsantrasyonları 1, 50 ve 500 µg/ml üçer defa hazırlanmış ve plasebo (PLGA Nanopartikül) ile aynı ortamda incelenmiştir. Dosetaksel için seçilen 1, 10 ve 100 µg/ml çözelti konsantrasyonları üçer defa hazırlanarak plasebo (PLGA Nanopartikül) ile aynı ortamda incelenmiştir. Günler arası için %geri elde ve tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için üç ardışık gün boyunca aynı konsantrasyonlarda deney tekrar edilmiştir.

### 3.2.6. Gözlemlenebilirlik ve Tayin Edilebilirlik Sınırı

Sinyal-gürültü oranını hesaplayarak gözlemlenebilirlik sınırı (limit of detection, LOD) 3'ten büyük ve tayin edilebilirlik sınırı (limit of quantification, LOQ) 10'dan büyük olarak kurkumin ve dosetaksel için ayrı ayrı analitik yöntemin duyarlılığı incelenmiştir.

## 3.3. Polisorbat 80 Miktar Tayini

Elde edilen liyofilize nanopartiküllerin sürfaktan ile kaplanması için 10 ml %1 polisorbat 80 (a/h) çözeltisi ile 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Kaplanmayan polisorbat 80'nin uzaklaştırılması için 14,500 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant saklanmıştır. Kalan polisorbat 80 kaplı PLGA nanopartiküller 2 defa 10 mL distile su ile yıkanmış ve yine aynı şekilde süpernatantları saklanmıştır. Nanopartikül yüzeyinde adsorbe edilmiş polisorbat 80 miktarı bulmak için

süpernatantlar birleştirilerek polisorbata 80 miktar tayini yapılmıştır. Polisorbata 80 miktar tayini için ise UV spektrofotometri yöntemidir. Polisorbata 80 çözeltinin UV spektrumu alınarak (190-380 nm) maksimum dalga boyu 234 nm’de analiz yapılmıştır. %0.015, %0.031, %0.062, %0.125 ve %0.25 polisorbata 80 (a/h) çözeltilerinin 234 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Deneyin başındaki polisorbata 80 miktarından süpernatantlardan elde edilen miktar çıkarıldıktan sonra adsorbe edilen polisorbata 80 miktarı elde edilmiştir.

### **Stok hazırlama**

1 mg polisorbata 80, 100 ml’lik balon jöjeye hassas terazide tartılarak ve seyreltme çözeltisi (mobil faz ile aynı) ile hacmine tamamlanmıştır (Stok çözeltisi, %1 h/h, n=3). Stok çözeltisi kullanılarak %0.015, %0.031, %0.062, %0.125 ve %0.25 konsantrasyonlarda standart çözeltiler seyreltme çözeltisi ile doğru oranlarda seyreltilerek hazırlanmıştır. HPLC analizine başlamadan önce bütün çözeltiler 0,22 µm PTFE filtresi ile filtre edilmiştir.

### **Doğrusallık**

Geliştirilen analitik yöntemde, analitin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olan analitin verdiği pik alanının ilişkisini (Correlation) incelemek için yapılmıştır. Polisorbata 80 için seçilen çözelti konsantrasyonları %0.015, %0.062 ve %0.25 (n=3) şeklindedir.

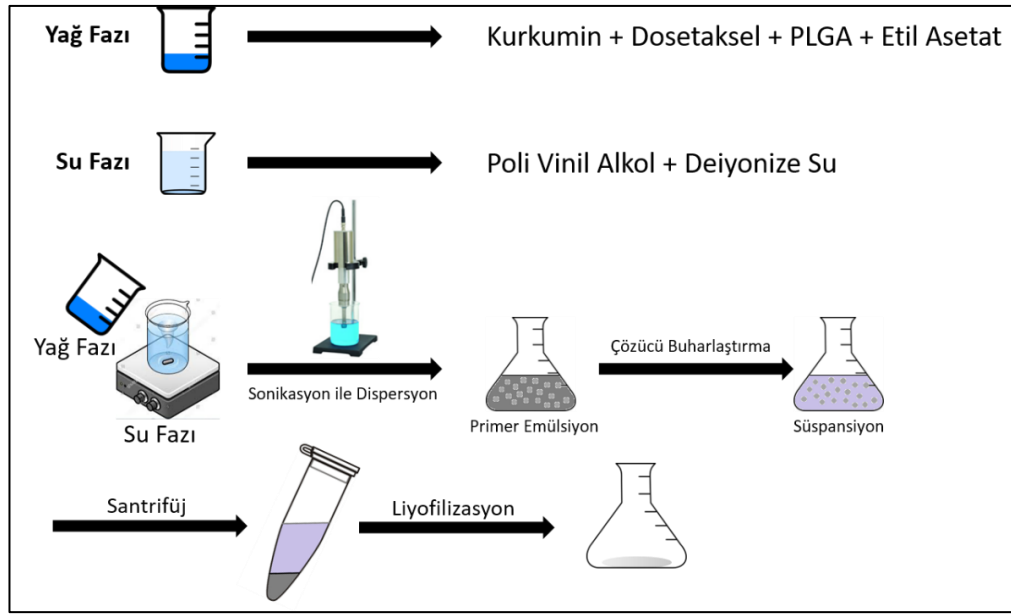
### **Doğruluk ve Kesinlik**

Geliştirilen analitik yöntemde, analitin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olan analitin verdiği absorbans elde edilen analit miktarı (% geri elde) ve tekrarlanabilirliğini incelemek için yapılmıştır. Polisorbata 80 için seçilen çözelti konsantrasyonları %0.015, %0.062 ve %0.25 üçer defa hazırlanmıştır. Günler arası

için %geri elde ve tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için üç ardışık gün boyunca aynı konsantrasyonlarda deney tekrar edilmiştir.

### 3.4. Kurkumin-Dosetaksel Yüklü Nanopartiküllerin hazırlanması

PLGA nanopartiküller tekli emülsiyon hazırlama yöntemi ile hazırlanmıştır (164). Öncelikli olarak farklı oranlarda PLGA, dosetaksel ve kurkumin etil asetat içerisinde çözündürerek organik faz oluşturulmuştur. İyonik olmayan sürfaktan olan PVA %1 oranında çözündürerek su fazı oluşturulmuştur. Su fazı üzerine organik faz yavaşça ve 550 rpm'de manyetik karıştırıcıda eklenmiştir. Ultrasonik prob yardımıyla %25 güçte ve 1 dakika (6 defa 10'ar saniye aralıklarla) boyunca buzlu su banyosu altında emülsiyon sonike edilmiş ve PLGA nanopartikülleri elde edilmiştir. PLGA, su, etil asetat hacimleri ve kurkumin miktarı *Box-Behnken* deney tasarımı yöntemi kullanılarak formülasyon optimize edilmiştir. 24 saat devamlı karıştırılarak organik faz uçurulmuştur. Organik solvan uçurulduktan sonra PLGA nanopartikülleri 14,500 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüjlenerek 3 kez distile su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında 1 ml %5 (a/a) manitol içeren çözeltilde süspande edilerek -60 °C sıcaklıkta dondurulup liyofilize edilmiştir. Nanopartiküllerinin kritik kalite özelliklerini etkileyebilecek formülasyon parametreleri olarak kurkumin/etil asetat oranı, PLGA/etil asetat oranı ve su/etil asetat oranı olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1.).



**Şekil 3.1.** Kurkumin ve dosetaksel yüklü PLGA nanoparküllerinin üretim akış şeması

### 3.5. Nanopartikül karakterizasyonu

#### 3.5.1. Nanopartiküllerin Morfolojisinin İncelenmesi

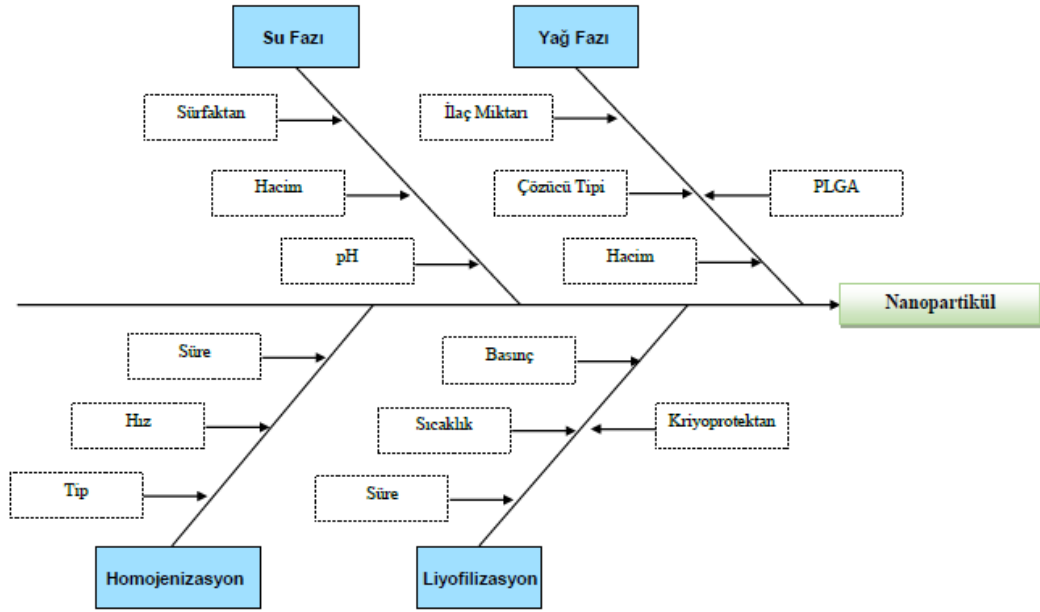
Nanopartiküllerin yüzey özelliklerin incelenmesi için taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskopu (TEM) kullanılmıştır. TEM numune hazırlamada nanopartiküller düşük iletkenlik gösterdiği karbon/bakır grid üzerinde tatbik edilmiştir. Uygun bir miktar boya ile muamele edildikten sonra kurutmaya bırakılmıştır ve sonrasında örnekleme alanları alınmıştır. SEM yönteminde ise sıvı haldeki örnekler vitroz karbon parçalar üzerine konarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra palladyum-platin tabakasıyla kaplanıp analiz yapılmıştır.

### 3.5.2. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Tayini

Hem nanopartikül boyutu hem de zeta potansiyeli ölçümleri Zetasizer Nanoseries-ZS cihazında gerçekleştirilmiştir. Her iki özellik tayini, foton korelasyon spektroskopisi ve dinamik ışık saçılımı prensibiyle yapılmıştır. Her bir formülasyon için üç ölçüm alınmış olup analizler 25°C'de, 173° açıda yapılmıştır.

### 3.6. Risk Faktörlerin Belirlenmesi

Dosetaksel ve kurkumin yüklü PLGA nanopartiküllerinin kritik kalite özelliklerini etkileyebilecek formülasyon ve proses parametrelerini belirlemek ve faktörlerin potansiyel etkilerini değerlendirmek amacıyla Ishikawa diyagramı oluşturulmuştur (165). Bilimsel literatüre dayanarak ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite ve enkapsülasyon etkinliği parametrelerinin nanopartiküllerinin terapötik etkinliğini etkileyeceği düşünüldüğünden bu parametreler kritik kalite özellikleri olarak kabul edilmiştir. Oluşturulan Ishikawa diyagramı üzerinde yapılan risk değerlendirilmesi sonucunda belirlenen parametreler ileri çalışmalara dahil edilmiştir (Şekil 3.2.).



**Şekil 3.2.** Nanopartiküllerinin kritik kalite özelliklerini etkileyebilecek formülasyon ve proses parametrelerin özeti (166).

### 3.7. Dositaksel-Kurkumin Nanopartiküllerinin Optimizasyonu: *Box-Behnken* Deney Tasarımı

Box Behnken Tasarımı, hedeflenen bölgeyi tanımlayan küpün her yüzeyinin orta noktalarından oluşmaktadır. Tasarım, ikinci dereceden tepki yüzeylerini anlamak için uygundur ve 3 veya daha fazla bağımsız değişkenle daha az deneme ile sonuç alınabilmektedir. Bu nedenle, deneylerin tasarımı için *Box-Behnken* Tasarımı kullanılmıştır. Deneysel faktörler ve faktör seviyeleri ön çalışmalar ve literatür araştırması sonucunda seçilmiştir. Seçilen bağımsız değişkenler organik/su oranı (h/h) (A), kurkumin konsantrasyonu (a/h) (B) ve PLGA konsantrasyonu (mg/mL) (C) iken cevap değişkenler partikül büyüklüğü (nm) ( $Y_1$ ), kurkumin enkapsülasyon etkinliği (%) ( $Y_2$ ) ve PDI değeri ( $Y_3$ ) seçilmiştir. Her bir bağımsız değişken için 3 farklı düzey belirlenmiştir (Tablo 3.4.). Dositaksel konsantrasyonu, yapılan önçalışmalar sonucunda kritik kalite özellikleri üzerinde etkisi olmadığı saptandığı için seçilmemiştir.

**Tablo 3.4.** Box-Behnken deney tasarımında kullanılan faktörler ve düzeyleri

Bağımsız Değişken	Düzy		
	Düşük	Orta	Yüksek
A: Yağ/Su Oranı (h/h)	0.1	0.2	0.3
B: Kurkumin Konsantrasyonu (a/h)	5	10	15
C: PLGA Konsantrasyonu (a/h)	30	50	70

Değişkenlerin cevap üzerindeki ilişkileri, ikinci dereceden denklem ile aşağıdaki formül ile analiz edilmiştir (Fomül 3.1.);

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} BC + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 + \beta_{33} C^2 \quad (3.1.)$$

Y, bağımlı değişkenidir;  $\beta_0$  bir sabittir;  $\beta_1, \beta_2, \beta_3$  doğrusal katsayılarıdır;  $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ , faktörler arası etkileşim katsayılarıdır;  $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$  ikinci dereceden katsayılarıdır. Proses parametreleri istenen cevabı elde etmek için optimize edilmiştir. Diğer tüm parametreler cevap değişkenlerdeki etkisini en aza indirmek için sabit tutulmuştur (Tablo 3.5.).

PVA konsantrasyonu önçalışmalarında %0.1, %0.5 ve %1 olarak konsantrasyonlarında kullanıldığında partikül büyüklüğünü bir miktar artışına ama PDI değerinin azalmasına ve daha homojen bir NP dağılımı oluşturduğu için %1 olarak seçilmiştir (167). Sonikasyon süresini ve sonikasyon gücünün artışı ile daha düşük ortalama büyüğü elde edilmesine rağmen heterojen bir partikül dağılımına ve enkapsülasyon etkinliğinin azalmasına sebep olmuştur (168). Bunun sebebi yüksek enerjinin, de-emülsifikasyon ve ısının oluşması olarak düşünülmektedir (169). Santrifüj hızının ve süresinin artırılması ile birlikte çökmüş NPlerin yeniden dağılıbilirlik azaldığı için bu optimum seviyelere karar verilmiştir(170).

**Tablo 3.5.** Box-Behnken deney tasarımında sabit olarak tutulan formülasyon ve proses parametreleri

Formülasyon ve proses parametreler	Düzy
Dosetaksiel konsantrasyonu (a/h)	1
PLGA moleküler ağırlığı (kDa)	7-17
Süfaktan tipi	PVA
PVA konsantrasyonu	% 1
Sonikasyon süresi	1 dakika
Sonikasyon gücü	%25
Santrifüj hızı	14,500 rpm
Santrifüj süresi	15 dakika

Deney tasarımının oluşturulması, deneylerin randomize edilmesi ve istatistiksel analizler için Minitab® 17 (Minitab Inc., ABD) yazılımı kullanılmıştır (Tablo 3.6.). Bütün formülasyonlar üçer defa hazırlanmıştır.



**Tablo 3.6.** Deney tasarım formülasyonları

Formülasyon	Yağ/Su Oranı (ml/ml)	Kurkumin Konsantrasyonu (mg/ml)	PLGA Konsantrasyonu (mg/ml)
F1	0.2	15	70
F2	0.2	15	30
F3	0.2	10	50
F4	0.3	15	50
F5	0.2	10	50
F6	0.1	10	70
F7	0.2	5	70
F8	0.3	5	50
F9	0.2	5	30
F10	0.1	15	50
F11	0.3	10	30
F12	0.3	10	70
F13	0.2	10	50
F14	0.1	5	50
F15	0.1	10	50

Modeller üç boyutlu bağımlı değişken yüzey grafiği olarak gösterilmiştir. Bağımsız değişkenler ve bağımlı değişkenler (cevap) arasındaki ilişkiyi kurmak için üç boyutlu yüzey çizimleri kullanılmıştır. İstatistiksel analiz için en uygun modeller,  $p$  değerinin  $< 0,05$  olasılık limitleri ile anlamlı olarak kabul edilmiştir. Formülasyonları optimize etmek için nanopartikül büyüklüğü minimum seviyede ve kurkumin enkapsülasyon etkinliği ve PDI'nınki maksimum seviyede hedef olarak belirlenmiştir.

Her bir cevap değişken için uygulanan çoklu regresyon analizinin ardından kurulan ikinci dereceden polinomial model aşağıdaki şekildedir (Formül 3.2.):

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2 \quad (3.2.)$$

Eşitlikte Y bağımlı değişkenini, A,B ve C faktörlerin ana etkilerini, AB, AC, BC faktörlerin etkileşim etkilerini,  $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$  faktörlerin ikinci dereceden (*quadratic*) etkilerini,  $\beta_0$  sabiti ve  $\beta_1$ - $\beta_3$  faktörlerin katsayılarını göstermektedir. Faktörlerin bağımlı değişkenleri üzerindeki etkilerinin anlamlılığının ve modelin bütünüünün test edilmesi için regresyon katsayılarının ( $\beta_1$ - $\beta_3$ ) *p* değerleri varyans analizi ile belirlenmiştir.

Bağımlı ve bağımsız değişkenlerle ilgili polinom denklemlerini oluşturduktan sonra, kurkumin-dosetaksel yüklü PLGA NP'lerinin partikül büyüklüğü ( $Y_1$ ), kurkumin enkapsülasyon etkinliği ( $Y_2$ ) ve PDI ( $Y_3$ ) değerleri optimize edilmiştir. En uygun bağımsız değişken değerleri belirlenerek optimum formülasyon ileri çalışmalarda kullanılmıştır.

### 3.8. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

Kurkumin, dosetaksel ve PLGA NP formülasyonlardaki durumunu değerlendirmek amacıyla, kurkumin, dosetaksel, PLGA, Boş PLGA, kurkumin-dosetaksel yüklenmiş PLGA NP Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (*Fourier transform infrared*, FTIR) ile incelenmiştir. 750-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında, 4  $\text{m}^{-1}$  çözünürlükte IR Prestige-21 (Shimadzu, Japonya) ihazı ile her bir numune için 10 defa tarama yapılmıştır.

### 3.9. Taramalı Elektron Mikroskopisi

Görüntülenen nanopartiküllerinin boyutunu, dağılımını, şeklini ve yüzey özelliklerini incelemek için taramalı elektron mikroskopisi (*Scanning Electron Microscope*, SEM) kullanılmıştır. Doğru bir ölçüm hem nanopartiküllerin hem de aletin özelliklerini dikkate alarak yapılmıştır. Quanta 400F yüksek çözünürlüklü alan emisyonu SEM (FEI, ABD) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. 20 kV hızlanma gerilimi kullanılmıştır. Nanopartiküller karbon bantlara yerleştirilip altın-palladyum karışımı ile 3-5 nm kalınlıkta püskürterek kaplanmıştır.

### 3.10. Transmisyon Elektron Mikroskobu

Süspande haldeki PLGA nanopartiküller grid üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan örnekler Tecnai G2 Spirit Biotwin transmisyon elektron mikroskobu (*Transmission Electron Microscope*, TEM) cihazı ile 20-120 kV aralığında incelenmiştir.

### 3.11. Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Zeta Potansiteli

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, polidispersite (PDI) ve zeta potansiyellerini incelemek için foton korelasyon spektroskopisi esasına dayanan Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments Ltd., İngiltere) cihazı kullanılarak 173° açıda ölçülmüştür. Öncelikle liyofilize nanopartiküller saf suda süspande edilerek oda sıcaklığında ölçümleri yapılmıştır. Ortalama nanopartikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli ölçümler üçer defa tekrarlanmıştır.

### 3.12. Enkapsülasyon Etkinliği

Enkapsülasyon etkinliğini (Nanopartiküle giren ve adsorbe edilen ilaç miktarı) hesaplamak için hazırlama sırasında kullanılan kurkumin ve dosetaksel miktarından, nanopartiküllerin satrifüjü sonrasında süpernatandaki ilaç miktarı (enkapsüle edilmemiş ilaç) çıkarılmıştır (Formül 3.3.). Hazırlama sırasında üç defa yıkanan nanopartiküllerin süpernatandaki ilaç miktarı da dahil edilmiştir. Hem kurkumin hem de dosetaksel miktar tayini üçer defa tekrarlanmıştır.

$$\text{Enkapsülasyon etkinliği} = \frac{\text{Nanopartiküllere yüklenen ilaç miktarı}}{\text{Formülasyonda kullanılan ilaç miktarı}} \times 100 \quad (3.3.)$$

### 3.13. *In Vitro* İlaç Salımı

Kurkumin % 90'ı nötr-baz pH (pH 7.0-7.4) koşullarında tampon sistemlerinde hızla bozulmaktadır (104, 171). % 10 fetal bovine serumu içeren PBS (pH 7.4) ortamında ve insan kanında, 1 saat içinde %20'den daha az kurkumin bozulduğu, 8 saat inkübasyondan sonrasında ise % 50'den fazla kurkumin kaldığı gözlemlenmiştir (104). Kurkumin ve dosetakselin çözeltideki çözünürlüğünü arttırmak ve sink koşulunu yerine getirmek için salım ortamına %0.1 polisorbata 80 eklenmiştir (128). *In vitro* kurkumin ve dosetaksel salım miktarının değerlendirilmesi için, aynı miktarda nanopartikül, %0,1 (a / h) polisorbata 80 içeren fosfat tamponlu salin (PBS) ve %10 FBS 10 mL ortamında eppendorf tüplerine dağıtılmıştır. Eppendorf tüpleri 37 °C'deki su banyosu içerisinde 100 rpm hızında çalkalamaya tabi tutulmuştur. 10 mL hacmindeki örnekler 1., 2., 4., 8., 12, 24., 48., 72. ve 96.saat zaman noktalarında alınmış ve 30 dakika boyunca 14,500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Her bir örnek alındıktan sonra çöken nanopartiküller yeni hazırlanmış ortamda disperse edilip su banyonundaki örnekler üzerine eklenerek salıma devam edilmiştir. Her bir zaman noktasında alınan örneklerin süpernatantları 0,22 µm PTFE filtre ile süzöldükten sonra HPLC ile kurkumin ve dosetaksel miktar tayini yapılmış ve salınan ilaç miktarı hesaplanmıştır. Salım analizleri her bir örnek için üçer defa tekrarlanmıştır.

Optimize edilmiş NP formülasyonundan ilaç salım mekanizmasını incelemek için, *in vitro* salım profilleri, sıfır derece (zamana karşı salınan kümülatif ilaç miktarı), birinci derece (zamana karşı kalan ilacın log kümülatif yüzdesi), Higuchi modeli (zamanın kareköküne karşı salınan ilacın kümülatif yüzdesi) ve Korsmeyer-Peppas (salınan ilacın log kümülatif yüzdesi - log süresi) salım denklemleri gibi çeşitli kinetik modellerle ilişkilendirilmiştir.

### 3.14. *In Vitro* Hücre çalışmaları

bEnd.3 endotel ve U87 glioma hücre hatları, Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (ATCC, LGC promochem, Rockville, MD, ABD) elde edilmiştir.

Beyin endotel hücre hatları arasında, fare bEnd.3 en iyi karakterize edilen ve in vitro ilaç taşıma çalışmaları için en yaygın kullanılanıdır (172). Ayrıca KBB çalışmalarında NP formülasyonun güvenilirlik çalışması yapılması gerekir. Beyine ilaç taşımak için kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerin normal beyin kapiler endotel hücrelerine zarar vermemelidir. Ayrıca bEnd.3 hücrelerde hücreye alım çalışmaları yapmak için uygundur (173).

Dosetaksel ve kurkuminin antikanser aktivitesini araştırmak için bir U87 sıçan modeli glioma hücre hattı kullanılmıştır.

Hücreler yüksek glukoz içeren full DMEM içinde, %10 fetal bovin serumu (FBS), %1 U/ml streptomisin ve %1 U/mL penisilin ile desteklenmiş ve %5 CO<sub>2</sub> nemlendirilmiş atmosferde 37 °C sıcaklık koşullarında inkübe edilmiştir. En uygun optik dansite elde edildikten sonra bEnd.3 ve U87 hücreleri için sırasıyla 10.000 ve 12.500 hücre/kuyucuk yoğunluğunda 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş 24 saat boyunca yukarıda bahsedilen koşullarda hücrelerin tutunması için bekletilmiştir.

### **3.14.1. Dosetaksel ve Kurkumin İçermeyen PLGA Nanopartiküllerinin biyoyumluluklarının İncelenmesi**

Beyin KBB yapısında bEnd.3 endotel hücrelerine toksik olmayan PLGA nanopartikül miktarları belirlenmiştir. Partikül miktarların hepsi, Tablo 3.7.'de gösterilen yüklenen DTX konsantrasyonuna göre hesaplanmıştır. PLGA polimerin ester ve asit terminal grupların toksisite üzerinde etkisi olup olmadığıda incelenmiştir. Öncelikle bEnd.3 hücreler mikroskop yardımı ile sayılmış ve 10,000 hücre 50 µL olarak 96 kuyucuklu plaklara ekilerek inkübe edilmiştir. Etkin madde içermeyen farklı konsantrasyonlarda PLGA NP 50 µL haciminde mevcut kuyucuklara eklenerek 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 5 mg/ml konsantrasyonda PBS içinde hazırlanan MTT çözeltisinden her kuyucuğa 25 µl eklenmiştir. 4 saat inkübasyon sonrasında her kuyucuğa 80 µL SDS-DMF (45:55 dimetilformamid:su içinde çözünmüş 200 g sodyum dodesil sülfat) çözeltisi eklenerek plakalar gece boyu inkübe edilmiştir. Son olarak plakalar 570 nm'de, mikroplak

okuyucuda absorbanları ölçülmüştür. Plakalarda sadece hücre kültürü ortamıyla inkübe edilen hücreler kontrol grubu olarak belirlenmiş olup, bu grubun hücre canlılığı %100 olarak değerlendirilmiştir. Kültür ortamındaki her bir grup için besi yeri ve partiküllerden gelebilecek oto floresan değeri çıkarılmıştır.

**Tablo 3.7.** Dosetaksel konsantrasyon-partikül miktar dönüşüm tablosu

Dosetaksel Konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	Partikül Miktarı (mg/ml)
5	0.48
2.5	0.24
1.25	0.12
0.62	0.06
0.31	0.03
0.16	0.015

### 3.14.2. Dosetaksel ve Kurkumin İçeren Nanopartiküllerin Sitotoksitelerinin İncelenmesi

Öncelikle kurkumin ve dosetaksel etkin maddelerin IC 50 değerlerinin belirlenmesi için ayrı ayrı olarak U87 glioma hücreleri üzerinde sitotoksiteleri MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. Aynı zamanda optimum kurkumin: ,dosetaksel oranını belirlemek için dosetaksel miktarı sabit tutulup kurkumin miktarı titre edilerek U87 hücrelerde sitotoksiteleri değerlendirilmiştir. Uygun olarak belirlenen kurkumin:dosetaksel oranına göre, PLGA NPlerine ilaçlar yüklenmiştir. Kurkumin çözeltisi, dosetaksel çözeltisi, kurkumin + dosetaksel çözeltisi, boş PLGA NP, kurkumin + dosektasel yüklü PLGA NP ve Polisorbat 80 kaplamalı kurkumin + dosektasel yüklü PLGA NP gruplara ayırarak U87 hücrelerine eklenmiştir (n = 4). Dosetakselin sitotoksik etki yerine sitostatik etkisi olmasından dolayı 120. saate kadar kadar inkübasyon süreleri denenmiştir ve en uygun inkübasyon süresine karar verilmiştir. En uygun inkübasyon süresi olarak seçilen 48 ve 72 saat inkübe edildikten

sonra her bir kuyucuğa 25 µL 5 mg/mL konsantrasyonda MTT çözeltisi eklenmiştir. 96 kuyucuklu plakalar inkübatörde 4 saat süreyle bekletildikten sonra 80 µL SDS-DMF (45:55 dimetilformamid:su içinde çözünmüş 200 g sodyum dodesil sülfat) çözeltisi eklenerek gece boyu bekletilmiştir. Son olarak plakalar mikropilaka okuyucuda 570 nm'de absorbanları ölçülmüştür. Kontrol grubu olarak formülasyonlarla aynı oranda su içeren besi yeri ortamı ve sadece besi yeri ortamı kullanılmıştır. Sonuçlar hesaplanırken kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edilmiş, besi yeri ve partiküllerden gelebilecek oto floresan değerleri çıkarılmıştır.

### **3.14.3. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımlarının İncelenmesi**

Hücre içine alım çalışmalarında, nil kırmızısı floresan özelliği olduğu için nanopartiküllere boya olarak yüklenmiştir. Nil kırmızısı ile yüklü polisorbata 80 kaplamalı ve kaplamasız PLGA nanopartikülleri kullanarak hücre içine alımları önce akım sitometri cihazı ile daha sonra floresan mikroskobu kullanarak incelenmiştir.

Akım sitometri çalışmalarında 24 kuyucuklu plakalar kullanılarak bEnd.3 ve U87 hücreleri için kuyucuk başına sırasıyla 200.000 hücre ve 250.000 olacak şekilde plakalara ekilmiştir. Belirlenmiş zaman noktalarında nanopartiküller ve hücreler PBS ortamında inkübe edildikten sonra hücreler toplanmış, akım sitometri ile floresan işaretli hücre yüzdesi ve bu hücrelerin ortalama floresan yoğunluğu (MFI) ölçülmüştür.

Floresan mikroskobu çalışmaları için ise 12 kuyucuklu plakalar kullanılarak bEnd.3 hücreleri için kuyucuk başına 400.000 hücre, U87 için 500.00 hücre olacak şekilde plakalara ekilmiştir. Hücreler inkübatörde gece boyu bekletildikten sonra kaplamalı ve kaplamasız nanopartikül formülasyonları PBS içerisinde hücrelere uygulanmış ve 8 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrası hücreler kaldırılmış ve mikroskopta hücrelerin görüntüleri çekilmiştir.

### 3.15. In Vivo Çalışmalar

İn vivo deneyler, geliştirilen formülasyonların beyne geçişinin in vivo olarak gösterilmesi amacıyla Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan izin alarak (52338575-31, Ek-1) CD1 farelerde gerçekleştirilmiştir. Her prosedür öncesinde, 50 mg/kg ketamin ve 4 mg/kg ksilazinin i.p. enjeksiyonu ile anestezi gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin in vivo görüntüleme sistemi ile takibi için kaplı ve kaplamasız nanopartiküller Flamma 774 boyası yüklenerek optimum formülasyon ile aynı şekilde hazırlanmış ve ardından kuyruk venine yerleştirilen bir kateter yardımıyla farelere 175 mg/kg konsantrasyonda 150 µl hacimde i.v. olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 2 saat sonra fareler anestezi altında dekapite edilerek tüm organları ve beyin dokusu çıkarılmış ve in vivo görüntüleme sistemi ile (Newton 7.0, Vilber) eksitasyon dalga boyu 774 nm emisyon dalga boyu ise 806 nm olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar niteliksel olarak değerlendirilmiştir.

Deney grupları aşağıdaki gibidir:

- Deney Grubu 1 (polisorbat 80 kaplı olmayan Flamma 774 yüklü PLGA NP.) (n=3)
- Deney Grubu 2 (Polisorbat 80 kaplı Flamma 774 yüklü PLGA NP) (n=3)
- Kontrol (Otofloresan) (n=1)

### 3.16. İstatistiksel Analiz

Aksi belirtilmedikçe tüm deneyler üçer kez tekrarlanmış olup standart sapma “±” olarak gösterilmiştir. 2 grup karşılaştırmalarında t-testi, ikiden fazla grup karşılaştırmalarda ANOVA ve akabinde Tukey's post hoc testi Minitab®17 yazılımı kullanılmıştır. P değerini 0.05'ten büyük olması gruplar arasında anlamlı fark vardır olarak değerlendirilmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonları

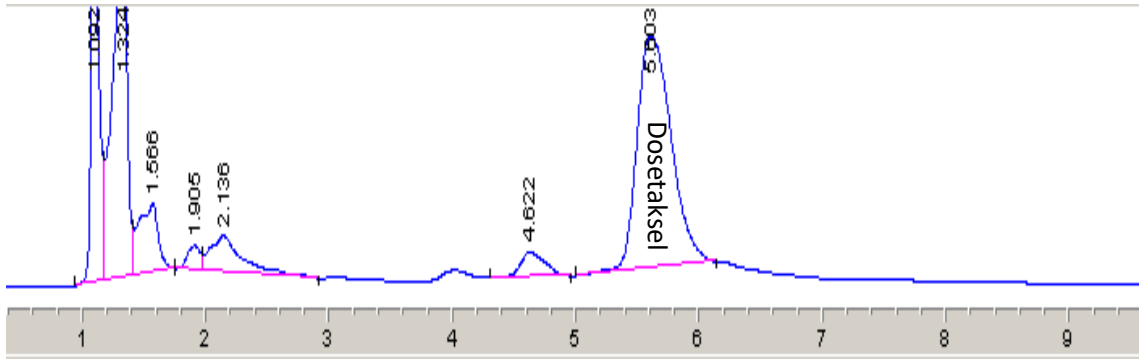
#### 4.1.1. Dosetaksel Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

Dosetakselin miktar tayinin yöntem geliştirilmesinde Avrup Farmakopesi (EP 9.0) monografından yararlanmıştır. Kurkumin, diğer yardımcı maddeler ve solvanlar ile girişim yapmayacağı şekilde 230 nm dalga boyu seçilmiştir. Dosetaksel monografından farklı olarak isokratik miktar tayin yöntemi kullanılmıştır. Miktar tayin yönteminin validasyonu için kullanılan DTX hammadesi asetonitril:su (50:50) karışımında çözündürülmüştür.

#### Özgünlük

Hareketli faz karışımı, PLGA asetonitrilde çözeltisi, plasebo karışımı (PLGA, PVA), PBS, PBS ve FSB karışımı (In Vitro salım ortamı), 50 ppm CCM çözeltisi ve 50 ppm DTX çözeltisi belirtilen HPLC yöntemi ile kromatogramları alındı ve çakışma yaparak karşılaştırılmıştır. Elde edilen kromatogramlar çakıştırılmış bir şekilde Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

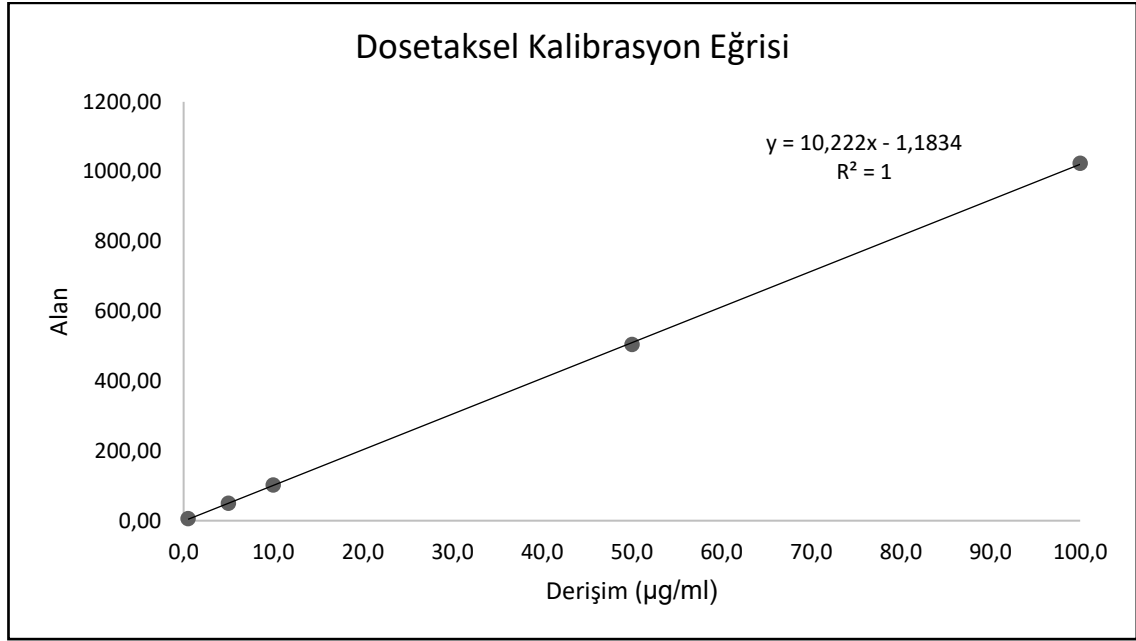
Kromatogramlarda dosetaksel piki ile girişim yapan herhangi bir pik gözlenmemiş ve yöntemin dosetaksel analizi için özgün olduğu sonucuna varılmıştır.



**Şekil 4.1.** 5.6. dk gelen dosetaksel pikidir. Pik saflığı %100 olarak gösterilmiştir.

### **Doğrusallık ve Aralık**

Geliştirilen analitik yöntemin doğrusallığı basit doğrusal regresyon analizi kullanılarak değerlendirilmiştir ve 0,50, 5, 10, 50 ve 100,0  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyon aralığında dosetaksel için yöntem doğrusal olarak bulunmuştur. Regresyon doğrusunun tanımlayıcılık katsayısı ( $R^2$ ) 1; intersept -1,1834 ve eğim 10,222 olarak bulunmuştur (Şekil 4.2.). Yapılan t testi ile eğimin sıfırdan farklı, dolayısıyla anlamlı ( $p < 0,05$ ) ve interseptin sıfırdan farksız, dolayısıyla anlamsız ( $p > 0,05$ ) olduğu gösterilmiştir. Regresyon analizinden kalibrasyon eşitliği elde edilmiş ve analiz edilen dosetaksel örneklerinde hesaplamalar bu eşitliğe göre yapılmıştır. Her bir konsantrasyon üç tekrar olarak çalışılmış ve sonuçlar arasında bağıl standart sapma değerleri %2'nin altında bulunmuştur.



**Şekil 4.2.** Dosetaksel analitik yöntemine ilişkin regresyon doğrusu. Y pik alanını ve X dosetaksel konsantrasyonunu göstermektedir.

### Stabilite

96 saat boyunca 10 µg/ml Dosetaksel çözeltinin stabilitesi incelenmiştir (Tablo 4.1.)

**Tablo 4.1.** Dosetaksel stabilite verileri

Saat	Alan	%Dosetaksel
0.Saat	112.9	% 100
1.Saat	112.1	% 99,3
2.Saat	115.9	% 102.9
4.Saat	116.8	% 103.4
8.Saat	116.2	% 102.9
12.Saat	109.6	% 97.1
24.Saat	109.8	% 97.2
48.Saat	114.5	% 101.4
96.Saat	114.0	% 100.9

## Doğruluk ve Kesinlik

Analitik yöntemin doğruluğu gün içi ve günler arası olarak incelenmiş ve varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında, geri kazanım değerleri ise %98-102 aralığında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar ile yöntemin uygun doğrulukta olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.2.).

**Tablo 4.2.** Dosetaksel analitik yöntemine ilişkin doğruluk ve kesinlik parametreleri sonuçları (n = 3).

Teorik konsantrasyon (µg/ml)	Deneysel Sonuçlar					
	Gün içi			Günler arası		
	Ortalama (µg/ml)	Geri elde (%)	Varyasyon katsayısı (%)	Ortalama (µg/ml)	Geri elde (%)	Varyasyon katsayısı (%)
0,50	0,50	100,4	1,4	0,50	100,1	1,5
5,0	5,00	100	1,9	4,95	99,0	1,2
10,0	10,1	101,1	1,1	10,05	100,5	1,0

## Gözlemlenebilirlik ve Tayin Edilebilirlik Sınırı

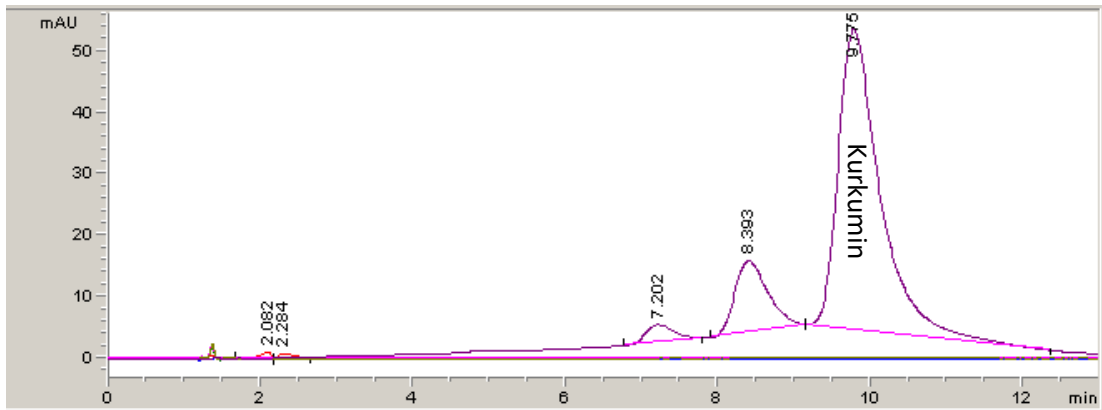
Dosetaksel için LOD 60.5 ng/ml (S/N = 3:1) ve LOQ 202 ng/ml (S/N = 10:1) olarak bulunmuştur. Geliştirilen analitik yöntemin duyarlılığı enkapsülasyon etkinliği ve in vitro ilaç salım çalışmalarında elde edilecek değerler için yeterli görülmüştür.

#### 4.1.2. Kurkuminin Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

Yöntem geliştirilmesine başlamadan önce kurkumin UV ve görünür bölge spektrumu alınmıştır. Kurkumin, diğer yardımcı maddeler ve solvanlar ile girişim yapmayacağı şekilde 425 nm dalga boyu seçilmiştir. Kurkumin pikini diğer kurkumin türevlerinden ayırabilmek için %5 asetik asit eklenmiştir. Stabilitesi ışıktan bozulduğu için amber renkli vialler ile çalışılmıştır. Miktar tayin yönteminin validasyonu için kullanılan kurkumin hammadresi asetonitril:su (50:50) karışımında çözündürülmüştür.

#### Özgünlük

Hareketli faz karışımı, PLGA asetonitrilde çözeltisi, plasebo karışımı (PLGA, PVA), PBS, PBS ve FSB karışımı (In Vitro salım ortamı), 50 ppm CCM çözeltisi ve 50 ppm DTX çözeltisi belirtilen HPLC yöntemi ile kromatogramları alındı ve çakışma yaparak Kromatogramlarda dosetaksel piki ile girişim yapan herhangi bir pik gözlenmemiş ve yöntemin dosetaksel analizi için özgün olduğu sonucuna varılmıştır. Hareketli faz karışımı, PLGA asetonitrilde çözeltisi, plasebo karışımı (PLGA, PVA), PBS, PBS ve FSB karışımı (In Vitro salım ortamı), 50 ppm CCM çözeltisi ve 50 ppm DTX çözeltisi belirtilen HPLC yöntemi ile kromatogramları alındı ve çakışma yaparak karşılaştırılmıştır. Elde edilen kromatogramlar çakıştırılmış bir şekilde Şekil 4.3.'de gösterilmiştir.

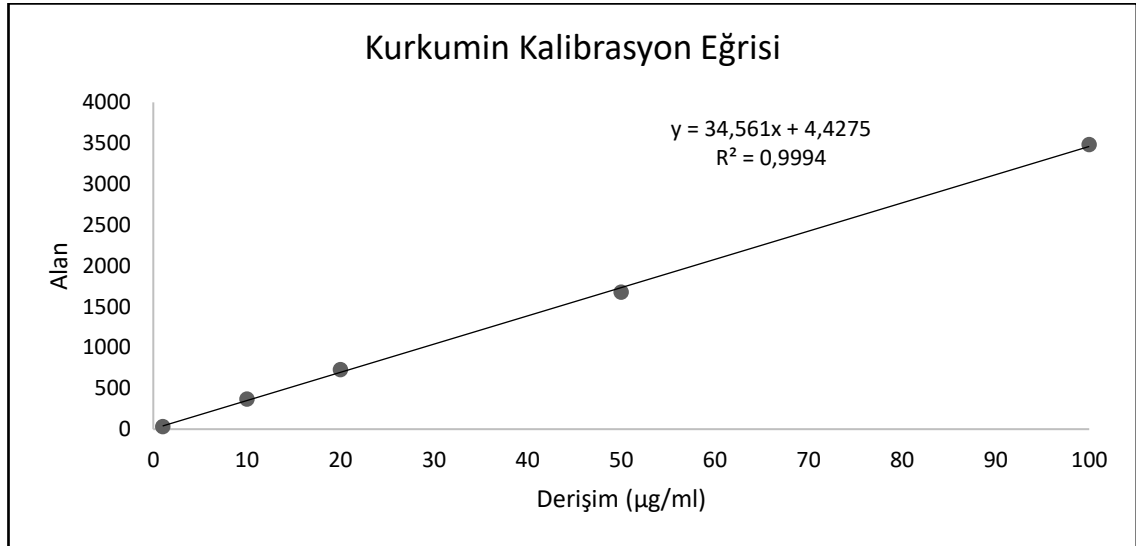


Şekil 4.3. 9.7. dk gelen kurkumin pikidir. Pik saflığı %100 olarak gösterilmiştir.

Kromatogramlarda kurkumin piki ile girişim yapan herhangi bir pik gözlenmemiş ve yöntemin dosetaksel analizi için özgün olduğu sonucuna varılmıştır.

### Doğrusallık ve Aralık

Geliştirilen analitik yöntemin doğrusallığı basit doğrusal regresyon analizi kullanılarak değerlendirilmiştir ve 1,0, 10,0, 20,0, 50,0 ve 100,0 µg/ml konsantrasyon aralığında dosetakseşl için yöntem doğrusal olarak bulunmuştur. Regresyon doğrusunun tanımlayıcılık katsayısı (R<sup>2</sup>) 0,9994; intersept 4,4275 ve eğim 34,561 olarak bulunmuştur (Şekil 4.4.). Yapılan t testi ile eğimin sıfırdan farklı, dolayısıyla anlamlı (p < 0,05) ve interseptin sıfırdan farksız, dolayısıyla anlamsız (p > 0,05) olduğu gösterilmiştir. Regresyon analizinden kalibrasyon eşitliği elde edilmiş ve analiz edilen dosetaksel örneklerinde hesaplamalar bu eşitliğe göre yapılmıştır. Her bir konsantrasyon üç tekrar olarak çalışılmış ve sonuçlar arasında bağıl standart sapma değerleri %2'nin altında bulunmuştur.



**Şekil 4.4.** Dosetaksel analitik yöntemine ilişkin regresyon doğrusu. Y pik alanını ve X dosetaksel konsantrasyonunu göstermektedir.

## Doğruluk ve Kesinlik

Analitik yöntemin doğruluğu gün içi ve günler arası olarak incelenmiş ve varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında, geri kazanım değerleri ise %98-102 aralığında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar ile yöntemin uygun doğrulukta olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.3.). Geliştirilen yöntem hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlara hassas olmalıdır bu sebeple 4 farklı konsantrasyon seçilmiştir.

**Tablo 4.3.** Kurkumin analitik yöntemine ilişkin doğruluk ve kesinlik parametreleri sonuçları (n = 3).

Teorik konsantrasyon (µg/ml)	Deneysel Sonuçlar					
	Gün içi			Günler arası		
	Ortalama (µg/ml)	Geri elde (%)	Varyasyon katsayısı (%)	Ortalama (µg/ml)	Geri elde (%)	Varyasyon katsayısı (%)
1,00	0,98	98,2	1,0	0,99	98,6	1,6
10,0	9,83	98,3	1,9	10,1	10,7	0,9
50,0	50,8	101,6	1,6	49,9	99,8	1,1
100,0	101,5	101,5	0,6	101,3	101,3	1,5

## Gözlemlenebilirlik ve Tayin Edilebilirlik Sınırı

Kurkumin için LOD 97.5 ng/ml (S/N = 3:1) ve LOQ 308 ng/ml (S/N = 10:1) olarak bulunmuştur. Geliştirilen analitik yöntemin duyarlılığı enkapsülasyon etkinliği ve in vitro ilaç salım çalışmalarında elde edilecek değerler için yeterli görülmüştür.

## Stabilite

Kurkuminin dosetaksele göre daha fazla stabilite sorunları vardır. *In vitro* salım deneyinin salım ortamına karar verebilmek için stabilite çalışması yapılmıştır. 100 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde 4 farklı ortamda (mobil faz, PBS, %10 FBS içeren PBS ve pH 6,5 PBS) CCM çözeltisi hazırlandı ve 60 dk boyunca stabilitesi HPLC miktar tayini yöntemi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar çözülmüş CCM miktarı olarak tablo 4.4'de özetlenmiştir.

**Tablo 4.4.** Farklı ortamlarda kurkumin stabilitesi %çözülmüş miktar olarak değerlendirilmiştir.

Zaman	Stok (mobil faz)	Stabilite	PBS	%10 FBS- PBS	pH 6.5 PBS	%Çözülmüş CCM Miktarı
<b>0.Sa</b>	3433.4	100.0	-	654.6	-	19.1
<b>24.Sa</b>	3394.9	98.9	-	776.6	-	22.9
<b>48.Sa</b>	3392.1	98.8	-	773.2	-	22.8
<b>72.Sa</b>	3233.1	94.2	-	718.7	-	22.2
<b>96.Sa</b>	3195.6	93.1	-	708.1	-	22.1

PBS, %10 FBS içeren PBS ve pH 6,5 PBS ortamlardaki CCM stabilitesini değerlendirmek için mobil fazda CCM çözeltisi %100 olarak kabul edilmiştir. Mobil fazda CCM çözeltisinde zaman ile CCM miktarı azalmaktadır. PBS ortamında CCM çözünürlüğü yoktur pH değerinden farksız olarak. %10 FBS PBS ortamına eklendikten sonra CCM çözünürlüğü ve stabilitesi artmaktadır. CCM stabilitesini arttıran FBS içeriğinde bulunan albumin olduğunu düşünülmektedir. Ortalama olarak 20 µg/ml konsantrasyona kadar %10 FBS içeren PBS ortamında *in vitro* salım deneylerinde salım ortamı olarak kullanılabilmiştir.

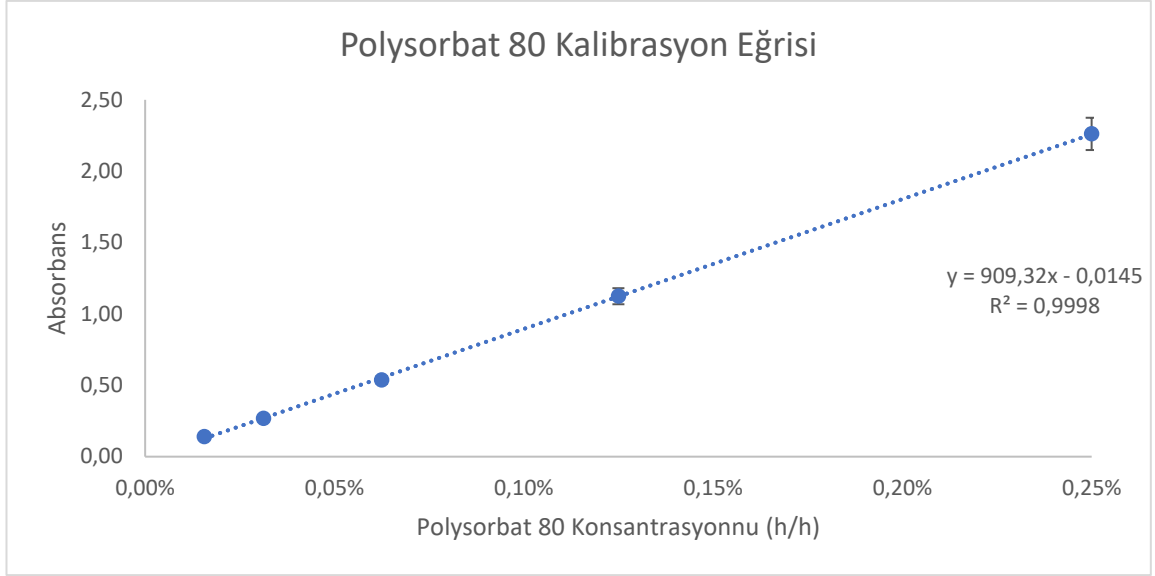


### 4.1.3. Polisorbat 80 Yöntem Validasyonu

Yöntem geliştirilmesine başlamadan önce polisorbat 80, UV ve görünür bölge spektrumu alınmıştır. Polisorbat 80, diğer yardımcı maddeler ve solvanlar ile girişim yapmayacağı şekilde ve en yüksek absorbans gösterdiği 234 nm dalga boyu seçilmiştir.

#### Doğrusallık ve Aralık

Geliştirilen analitik yöntemin doğrusallığı basit doğrusal regresyon analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. %0.015, %0.031, %0.062, %0.125 ve %0.25 polisorbat 80 (a/h) çözeltilerin 234 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Regresyon doğrusunun tanımlayıcılık katsayısı ( $R^2$ ) 0,9998; intersept 0,0145 ve eğim 909,32 olarak bulunmuştur (Şekil 4.5.). Yapılan t testi ile eğimin sıfırdan farklı, dolayısıyla anlamlı ( $p < 0,05$ ) ve interseptin sıfırdan farksız, dolayısıyla anlamsız ( $p > 0,05$ ) olduğu gösterilmiştir. Her bir konsantrasyon üç tekrar olarak çalışılmış ve sonuçlar arasında bağıl standart sapma değerleri %2'nin altında bulunmuştur.



**Şekil 4.5.** Polisorbat 80 analitik yöntemine ilişkin regresyon doğrusu. Y pik alanını ve X dosetaksel konsantrasyonunu göstermektedir.

### **Doğruluk ve Kesinlik**

Analitik yöntemin doğruluğu gün içi ve günler arası olarak incelenmiş ve varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında, geri kazanım değerleri ise %98-102 aralığında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar ile yöntemin uygun doğrulukta olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.5.). Geliştirilen yöntem hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlara hassas olmalıdır bu sebeple 4 farklı konsantrasyon seçilmiştir.

**Tablo 4.5.** Polisorbat 80 analitik yöntemine ilişkin doğruluk ve kesinlik parametreleri sonuçları (n = 3).

Teorik konsantrasyon (µg/ml)	Deneysel Sonuçlar					
	Gün içi			Günler arası		
	Ortalama (% , h/h)	Geri elde (%)	Varyasyon katsayısı (%)	Ortalama (% , h/h)	Geri elde (%)	Varyasyon katsayısı (%)
%0.015	0.015	99,8	0.2	0.015	98,7	1,2
%0.062	0.061	98,4	0.6	0.062	101,8	1,4
%0.25	0.247	98.8	0.5	0.253	101,2	1,1

#### Gözlemlenebilirlik ve Tayin Edilebilirlik Sınırı

Polisorbat 80 için LOD ve LOQ, S (yanıtın bağıl standart sapması) ve  $\sigma$  (kalibrasyon eğrisinin eğimi) kullanılarak ICH klavuzuna göre hesaplanmıştır.  $LOD=3.3 \times \sigma/S$  ve  $LOQ=10 \times \sigma/S$ .

$$LOD= 3.3 \times 0.55 / 909.32 = \%0.00199$$

$$LOQ= 10 \times 0.55 / 909.32 = \%0.0060$$

#### 4.2.Dosetaksel ve Kurkumin Yüklü Nanopartiküllerinin Optimizasyonu: Box-Behnken Deney Tasarımı

Deneysel faktörler ve faktör seviyeleri ön çalışmalar ve literatür araştırması sonucunda seçilmiştir. Seçilen bağımsız değişkenler yağ/su oranı (h/h) (A), kurkumin konsantrasyonu (a/h) (B) ve PLGA konsantrasyonu (mg/mL) (C), cevap değişkenler partikül büyüklüğü (nm) (Y1), kurkumin enkapsülasyon etkinliği (%) (Y2) ve PDI değeri (Y3) üzerinde etkileri açıklanmıştır. Deneylerin sonuçları Tablo 4.6.'te özetlenmiştir.

**Tablo 4.6.** Box-Behnken deney tasarımı ile elde edilen bağımlı değişken değerleri.

Formülasyon	Y <sub>1</sub> : Partikül Büyüküğü (nm)	Y <sub>2</sub> : Kurkumin Enkapsülasyon Etkinliği (%)	Y <sub>3</sub> : PDI
F1	253.1	99.48	0.057
F2	214.3	98.94	0.074
F3	234.9	98.99	0.043
F4	295.6	99.66	0.033
F5	237.3	99.07	0.060
F6	165.0	93.29	0.100
F7	257.4	90.76	0.040
F8	298.5	98.86	0.054
F9	224.2	97.40	0.065
F10	158.9	96.59	0.077
F11	225.2	99.54	0.095
F12	299.0	99.78	0.185
F13	176.0	99.28	0.040
F14	116.0	88.98	0.095
F15	106.1	93.71	0.165

Faktörlerin matematiksel ilişkisi ve katsayıları ile regresyon analizi yoluyla elde edilen cevap değişkenlerine ilişkin  $p$  değerleri Tablo 4.7.'te gösterilmiştir.  $p$  değerleri 0,05'ten küçük olan faktörler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

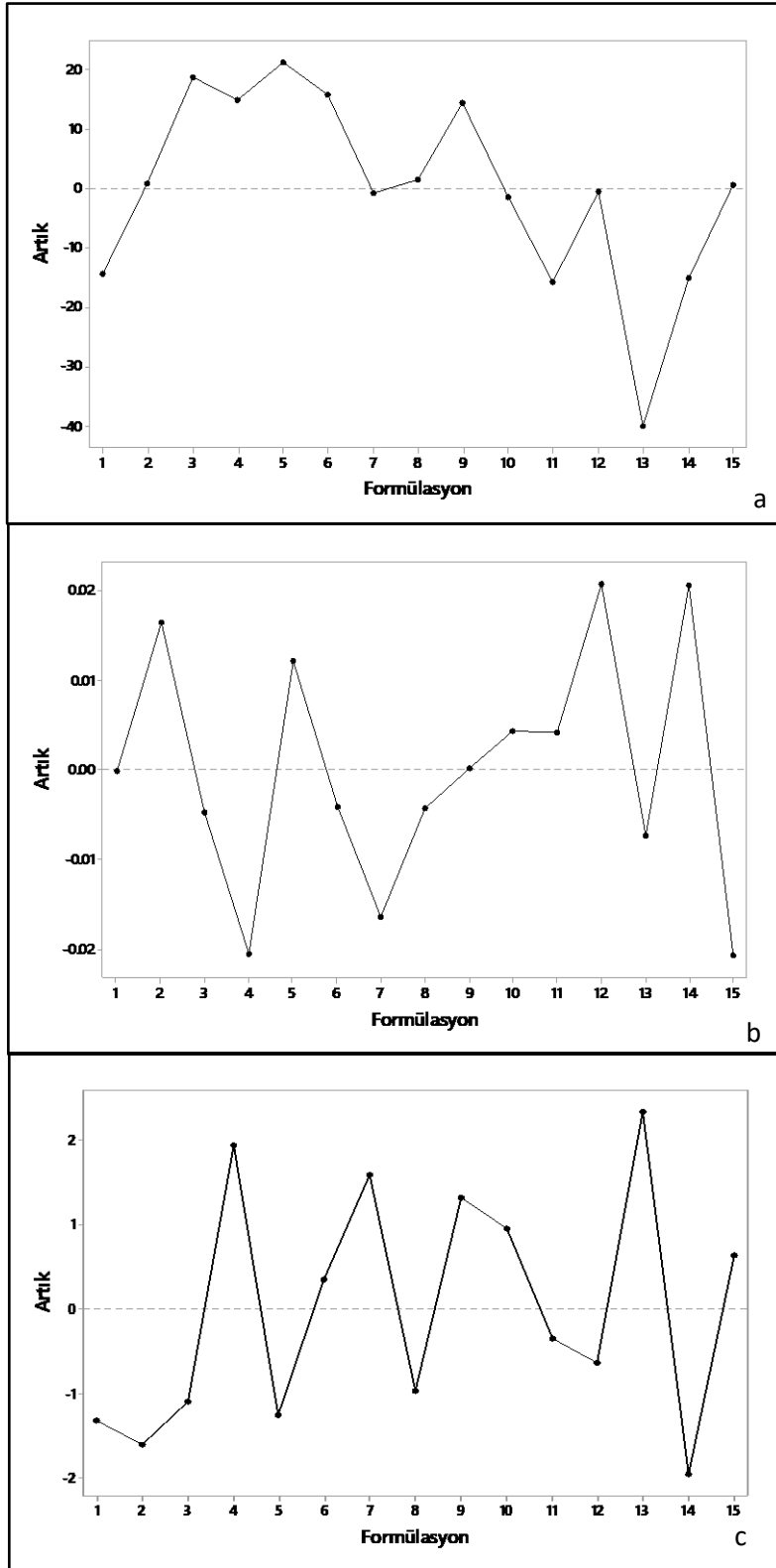
**Tablo 4.7.** Faktörlerin kestirilen regresyon katsayıları ve ilgili p değerleri.

	Y1: Partikül Büyüküğü (nm)		Y2: Kurkumin Enkapsülasyon Etkinliği (%)		Y3: PDI	
	Katsayı	p değeri	Katsayı	p değeri	Katsayı	p değeri
$\beta_0$ : Sabit	216.1	<0,001	97,15	<0,001	0,0478	0,015
A: Yağ/su oranı (h/h)	71,52	<0,001	1,479	0,134	-0,0089	0,318
B: Kurkumin konsantrasyonu (a/h)	3,23	0,0753	0,021	0,981	-0,0017	0,841
C: PLGA konsantrasyonu (a/h)	25,6	0,046	0,168	0,847	-0,0022	0,793
AB	-11,4	0,443	-2,16	0,124	-0,0005	0,969
AC	3,7	0,798	-0,02	0,986	0,0389	0,018
BC	1,4	0,923	0,16	0,894	0,0023	0,844
A <sup>2</sup>	-18,6	0,250	0,30	0,25	0,047	0,010
B <sup>2</sup>	19,8	0,225	-0,43	0,35	-0,0301	0,051
C <sup>2</sup>	1,4	0,928	1,13	0,93	0,0413	0,017

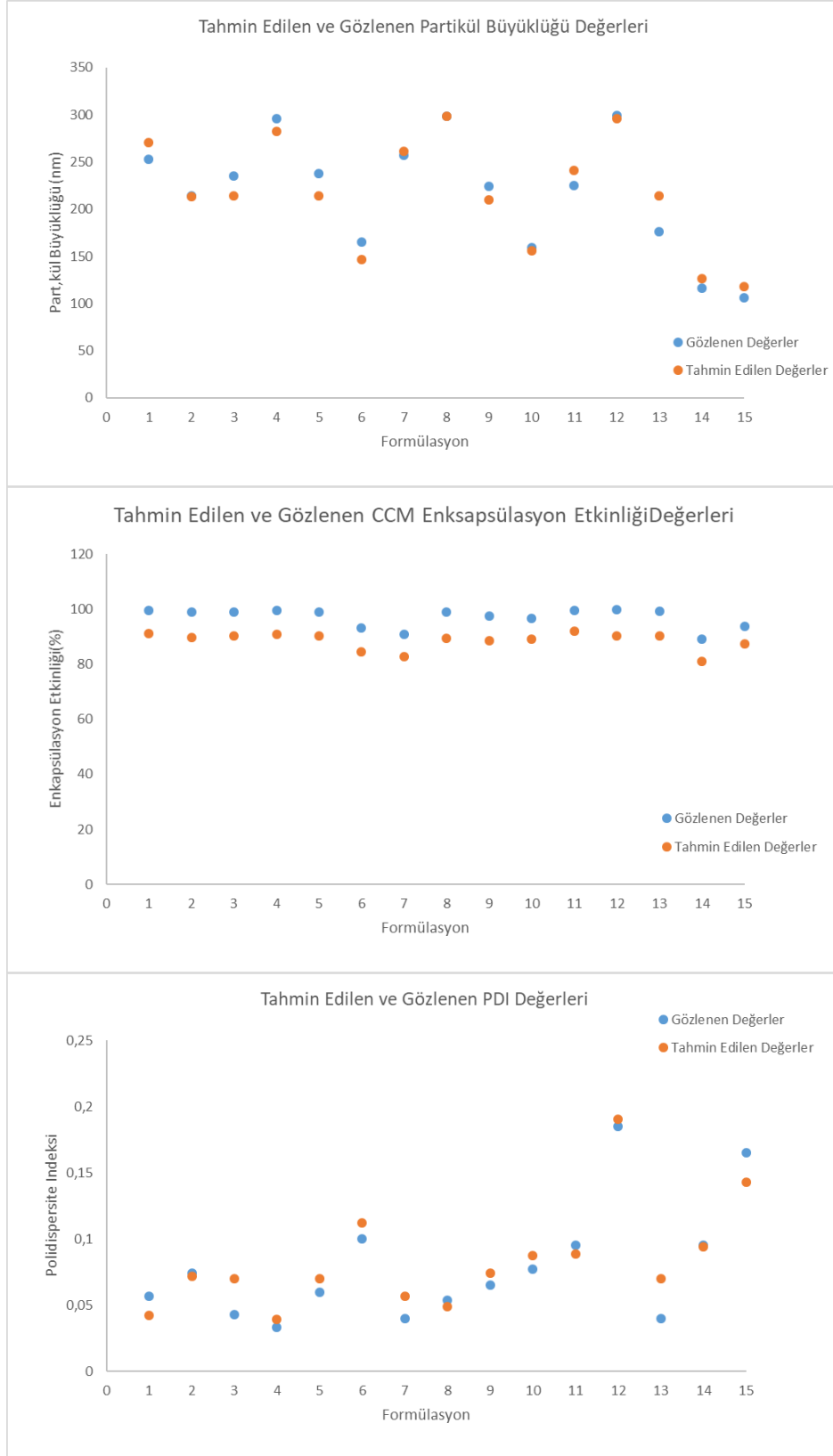
A, B ve C bağımsız değişkenlerin  $Y_1$ ,  $Y_2$  ve  $Y_3$  cevaplarını tanımlayabilme korelasyon olarak (model uyumu)  $R^2$  değerleri ile değerlendirilmiştir. Partikül büyüklüğü ve PDI için  $R^2$  değeri sırasıyla 0,9294 ( $p = 0.021$ ) ve 0,9079 ( $p = 0.038$ ) bulunmuştur ve modelin uyumunun anlamlı olduğunu göstermiştir. Kurkumin enkapsülasyon etkinliği için  $R^2$  değeri 0,607 olarak bulunmuş ve modelin uyumu anlamsız olarak değerlendirilmiştir. Dolayısıyla ileri değerlendirmelerde ve tasarım aralığının oluşturulmasında kurkumin enkapsülasyonu kapsam dışında bırakılmıştır. Model uyumundan değer farkları (artık) Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.

Faktörlerin ana etkileri değerlendirildiğinde kurkumin ve dosetaksel yüklü nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü üzerinde en anlamlı etkiye sahip faktörler sırasıyla yağ/su oranı, PLGA konsantrasyonu ve kurkumin konsantrasyonu olmuştur. Kurkumin konsantrasyonu partikül büyüklüğü üzerindeki etkisi anlamsız olarak

değerlendirilmiştir ( $p < 0,05$ ). Artan yağ/su oranı ve PLGA konsantrasyonu partikül büyüklüğü üzerinde pozitif etkiye sahiptir yani partikül büyüklüğünü artmıştır.



Şekil 4.6. Normal olasılık grafikleri: a) partikül büyüklüğü, b) PDI ve c) kurkumin enkapsülasyon etkinliği.



**Şekil 4.7.** Cevap değişkenlerin tahmin edilen ve gözlenen değerleri



Etkileşim etkileri, organik/su oranı ve PLGA konsantrasyonu dışında ( $p < 0,05$ ) dışında, ve ikinci dereceden etkiler anlamlı bulunmamıştır.

Partikül büyüklüğü değerinin tahmin amacıyla kurulan ikinci dereceden polinomial model aşağıdaki şekildedir (Formül 4.1.).

$$Y_1 = 216,1 + 71,52A + 3,23B + 25,6C - 11,4 AB + 3,7 AC + 1,4 BC - 18,6 A^2 + 19,8 B^2 + 1,4 C^2 \quad (4.1.)$$

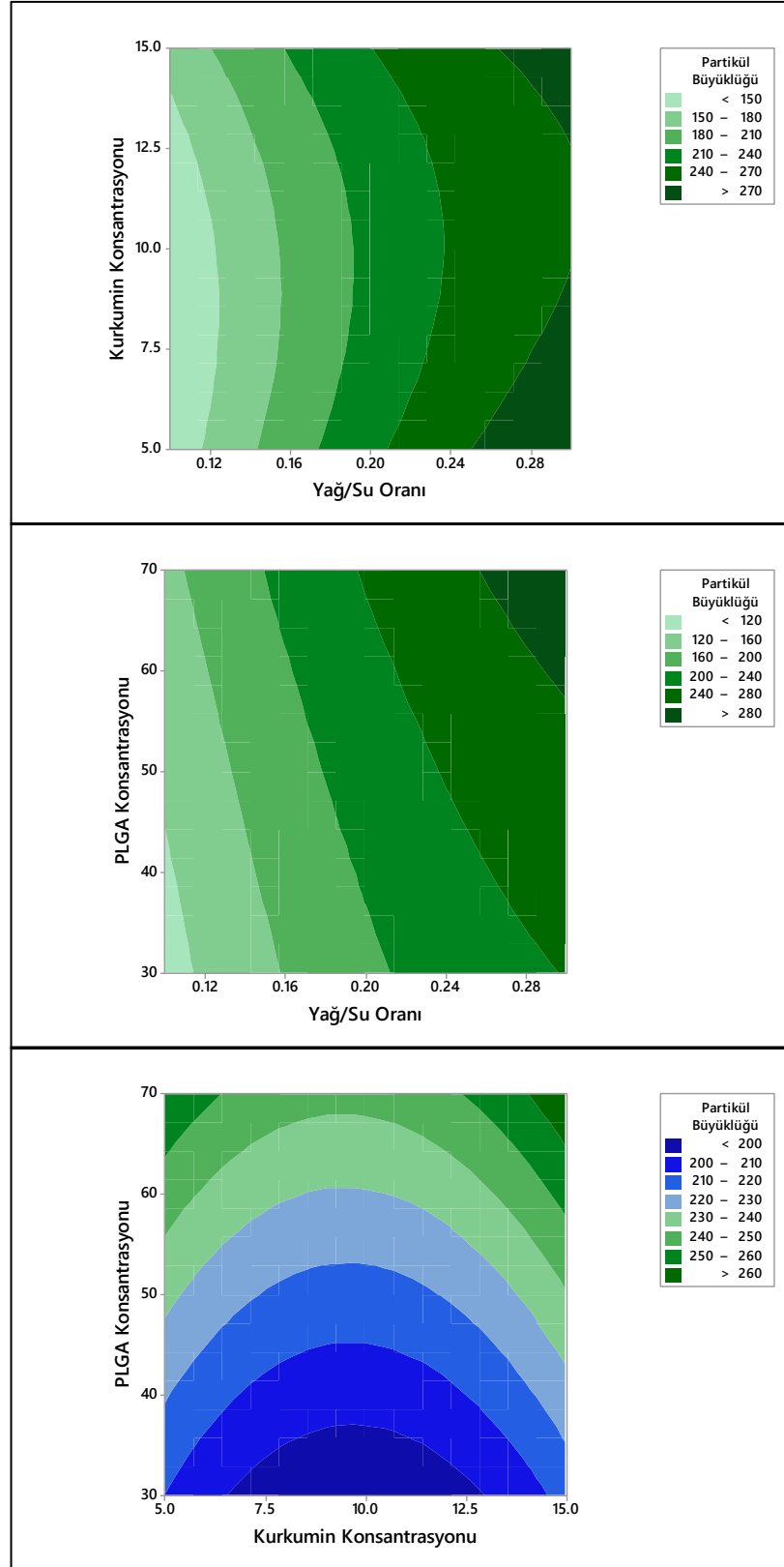
PDI değerlendirmesinde sırasıyla en etkili faktörler yağ/su oranı ve PLGA konsantrasyonu etkileşimi, ikinci dereceden yağ/su oranı ve PLGA konsantrasyonu etkisi olarak bulunmuştur. Artan yağ/su oranı ve PLGA konsantrasyonu etkileşim değeri, yağ/su oranı karesi ve PLGA konsantrasyonu karesi değerleri PDI artışa neden olmuştur. Buna ek olarak, yağ/su oranı ( $p = 0,318$ ), kurkumin konsantrasyonu ( $p = 0,841$ ), PLGA konsantrasyonu ( $p = 0,793$ ), yağ/su oranı ve kurkumin konsantrasyonu etkileşimi ( $p = 0,969$ ), PLGA konsantrasyonu ve kurkumin konsantrasyonu etkileşimi etkileri anlamsız bulunmuştur. Kurkumin konsantrasyonun karesi ( $p = 0,051$ ) neredeyse anlamlı bulunmuştur. Yüzey cevap grafiklerinde gözlenen eğrilik (*quaratic*) etkileşim etkilerinin varlığını doğrulamaktadır.

PDI değerinin tahmin amacıyla kurulan ikinci dereceden polinomial model aşağıdaki şekildedir (Formül 4.2.).

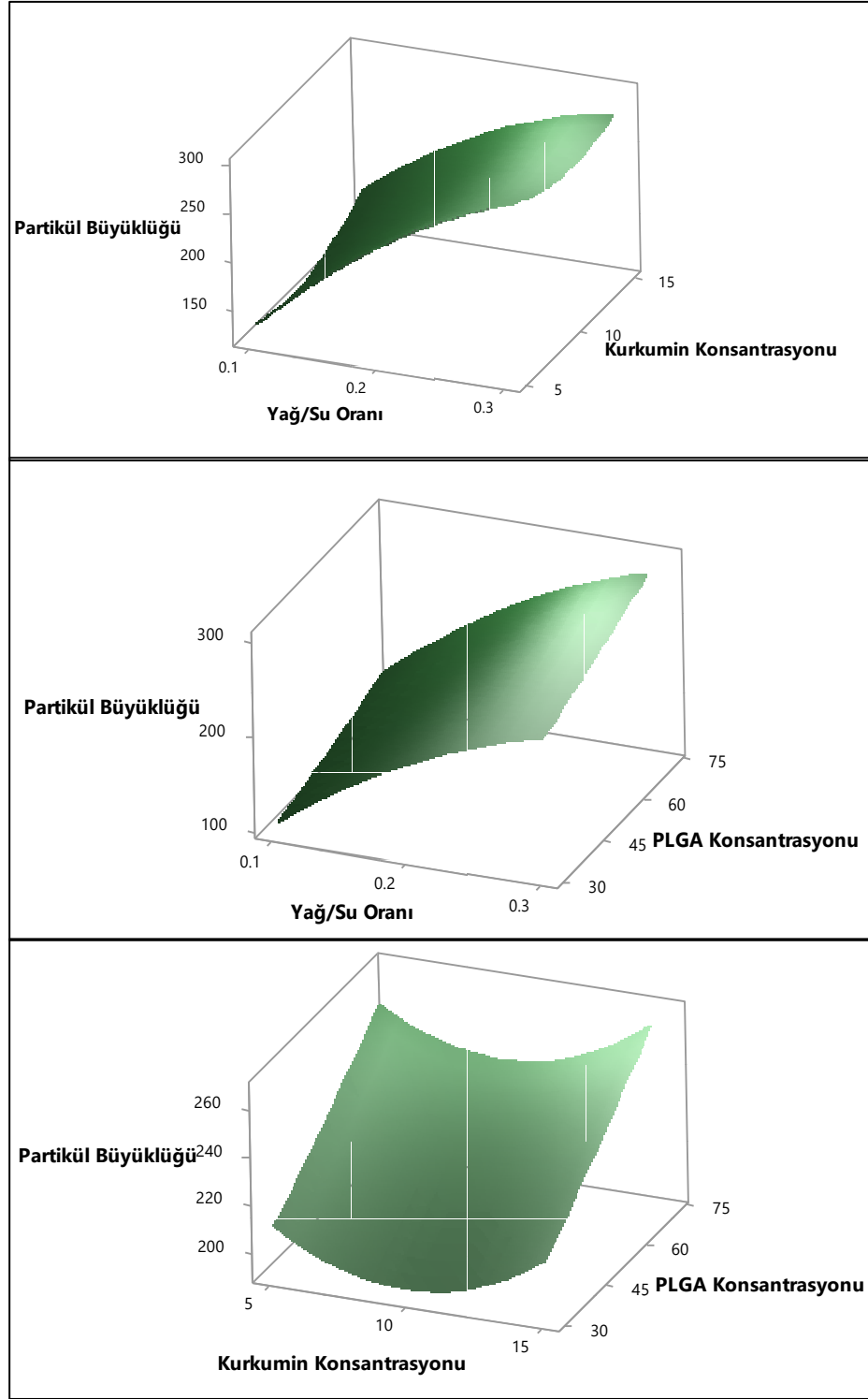
$$Y_3 = 0,0478 - 0,0089A - 0,0017B - 0,0022C - 0,0005AB + 0,0389AC + 0,0023 BC + 0,047A^2 - 0,0301B^2 + 0,0413C^2 \quad (4.2.)$$

Tahmin edilen ve deneysel olarak bulunan sonuçlar arasında ilişkileri şekil 4.7.'de özetlenmiştir

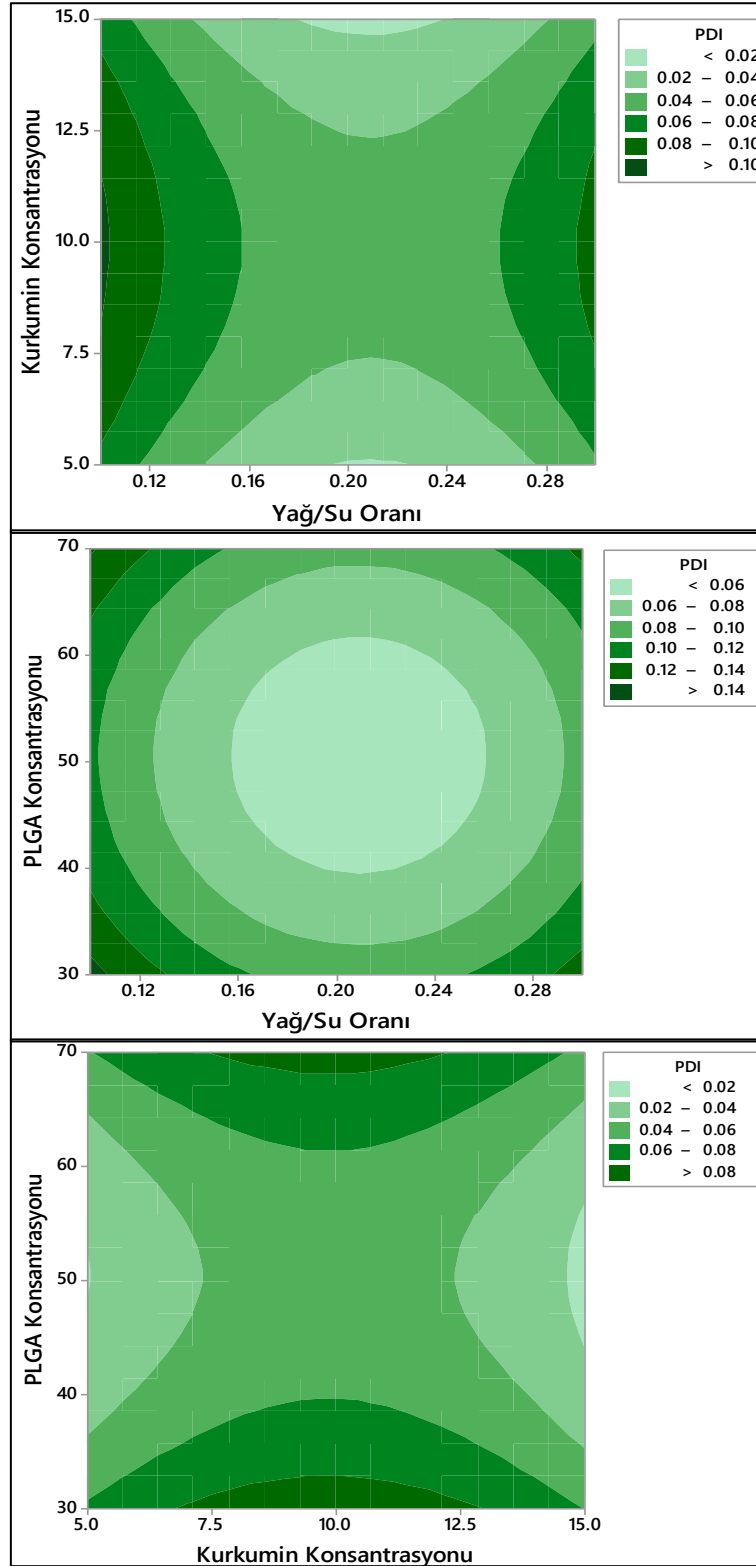
Faktörlerin etkilerinin daha detaylı değerlendirilmeleri için partikül büyüklüğü (Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.) ve PDI (Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.) verileri kontur ve yüzey cevap grafikleri ile görselleştirilmiştir.



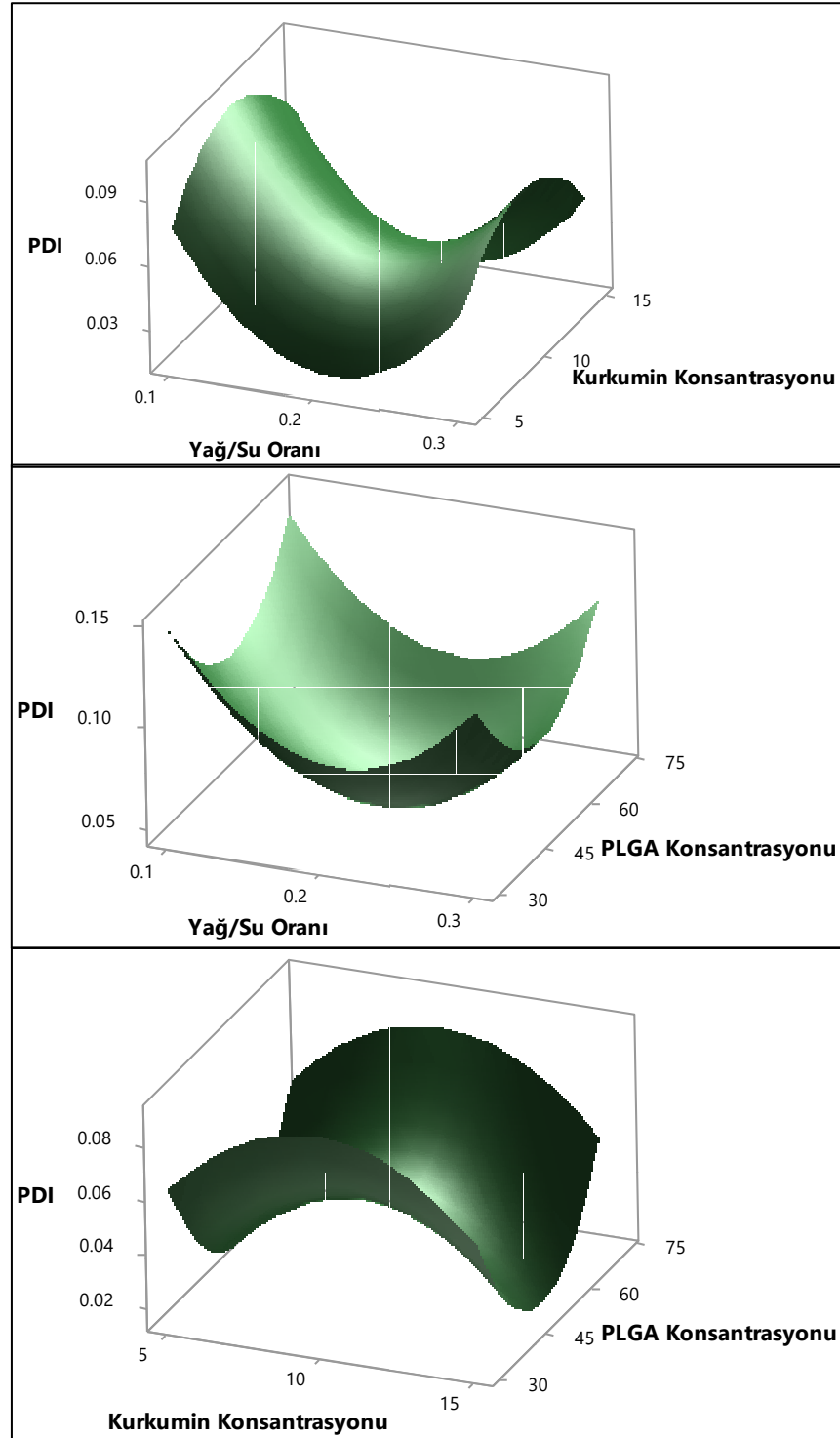
**Şekil 4.8.** Kurkumin ve dosetaksel yüklü nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü üzerine yağ/su oranı, kurkumin konsantrasyonu ve PLGA konsantrasyonunun etkisini gösteren kontur grafikleri.



**Şekil 4.9.** Kurkumin ve dozetaksel yüklü nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü üzerine yağ/su oranı, kurkumin konsantrasyonu ve PLGA konsantrasyonunun etkisini gösteren yüzey cevap grafikleri.



**Şekil 4.10.** Kurkumin ve dozetaksel yüklü nanopartiküllerinin PDI üzerine yağ/su oranı, kurkumin konsantrasyonu ve PLGA konsantrasyonunun etkisini gösteren kontur grafikleri.



**Şekil 4.11.** Kurkumin ve dosetaksel yüklü nanopartiküllerinin PDI üzerine yağ/su oranı, kurkumin konsantrasyonu ve PLGA konsantrasyonunun etkisini gösteren yüzey cevap grafikleri.

Faktörlerin cevap değişkenleri üzerine etkisini açıklayan matematiksel modeller kurulduktan sonra hedeflenen partikül büyüklüğü ( $< 200$  nm) ve PDI değeri ( $< 0,125$ ) değerlerine ulaşmak için gerekli faktör kombinasyonlarını gösteren bir tasarım aralığı elde edilmiştir.

Tasarım aralığı oluşturulduktan sonra hedeflenen partikül büyüklüğü ve PDI değerine sahip olabileceği öngörülen bir optimum formülasyonun hazırlanması için hedef fonksiyonu (*desirability function, d*) yöntemi kullanılmıştır. Bire yakın d değeri hedeflenen cevap değişkenlerine yaklaşıldığını gösterirken sıfıra yakın d değeri, hedeflenen cevap değişkeninden uzaklaşıldığını göstermektedir. Bu amaçla, kısıtlayıcı (*constraint*) olarak minimum partikül büyüklüğü ( $< 200$  nm) ve maksimum PDI değeri ( $< 0,125$ ) belirlenmiştir. Tasarım aralığı oluşturulurken elde edilen bilgiler doğrultusunda hedeflenen değerlere ulaşmak yağ/su oranı 0,11 (düşük düzey), kurkumin konsantrasyonu 5 mg/ml (düşük düzey) ve PLGA konsantrasyonu 47 mg/ml (orta düzey) olarak belirlenmiştir. Bu konfigürasyon ile elde edilen d değeri 0,81 olarak bulunmuştur. Optimum formülasyon bileşenlerin miktarları Tablo 4.7.'de gösterilmiştir. Tahmin edilen değerler ile gözlenen değerlere ilişkin veriler Tablo 4.8.'de verilmiştir.

**Tablo 4.7.** Optimum formülasyon bileşenlerin miktarları

Optimum Formülasyon	PLGA (mg)	Kurkumin (mg)	Dosetaksel (mg)	Etil asetat (ml)	Su (ml)	PVA (mg)
	42,5	4,5	3,5	1,1	10	100

**Tablo 4.8.** Hedeflenen değerlerin fonksiyonu temel alınarak geliştirilen optimum Kurkumin ve dosetaksel yüklü nanopartikül formülasyonuna ilişkin deneysel ve tahmin değerler.

Bağımlı Değişken	Gözlenen	Tahmin edilen	Fark	Hata (%)
Partikül Büyüklüğü (nm)	151,2	144,1	7,1	4,93
PDI Değeri	0,057	0,063	0,006	9,52

### 4.3.Enkapsülasyon Etkinliği

Box-Behnken tasarımı kapsamında elde edilen kurkumin enkapsülasyon etkinlikleri %88,98 ile %99,78 arasında bulunmuştur (tablo 4.9.). Optimum formülasyonda ise CCM enkapsülasyonu  $99,77 \pm 0,03$  ve DTX için  $94,65 \pm 3,21$  olarak bulunmuştur (tablo 4.10.).

**Tablo 4.9.** Box-Behnken deney tasarımı kapsamında hazırlanan formülasyonların kurkumin enkapsülasyon etkinliği değerleri (n = 3).

Formülasyon	Enkapsülasyon Etkinliği (%)	Standart sapma
F1	99,48	0,09
F2	98,94	0,044
F3	98,99	0,06
F4	99,66	0,11
F5	99,07	0,14
F6	93,29	0,48
F7	90,76	0,50
F8	98,86	0,41
F9	97,40	0,02
F10	96,59	0,10
F11	99,54	0,05
F12	99,78	0,01
F13	99,28	0,20
F14	88,98	0,06
F15	93,71	0,20

**Tablo 4.10:** Optimum formülasyonun kurkumin ve dosetaksel enkapülasyon etkinliği değerleri (n = 3).

Formülasyon	CCM Enkapülasyon Etkinliği (%)	DTX Enkapülasyon Etkinliği (%)
Opt. F1	99,81	96,30
Opt. F2	99,25	90,01
Opt. F3	100,24	92,02
Ortalama	99,77	94,65
Standart Sapma	0,50	3,21

#### 4.4.Polisorbat 80 Miktar Tayini

Liyofilize boş PLGA NP'ler 30 dk boyunca %1 polisorbat 80 çözeltisinde karıştırarak bekletilmiştir. Fazla olan polisorbat 80 uzaklaştırmak için 3 defa saf su ile santrifüjlenerek yıkanmıştır. Süpernatantlar saklandı ve 234 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Ester ve asit ucu olan PLGA arasında kaplama açısından fark olup olmadığını ve PLGA uç fonksiyonel grupların polisorbat 80 adsorpsiyonu etkileyip etkilemediği göstermek adına her PLGA NP'e adsorbe edilen polisorbat 80 miktarı ölçülmüştür. Deneyler üç tekrar olarak çalışılmıştır.

Süpernatantlar saklandı ve kalibrasyon eğrisi konsantrasyon aralığına getirmek için 40 ml'ye su ile seyreltilmiştir (4 kat seyreltilmiştir). Hem ester hem de asit terminal uçlu PLGA için elde edilen veriler Tablo 4.11.'de verilmiştir.



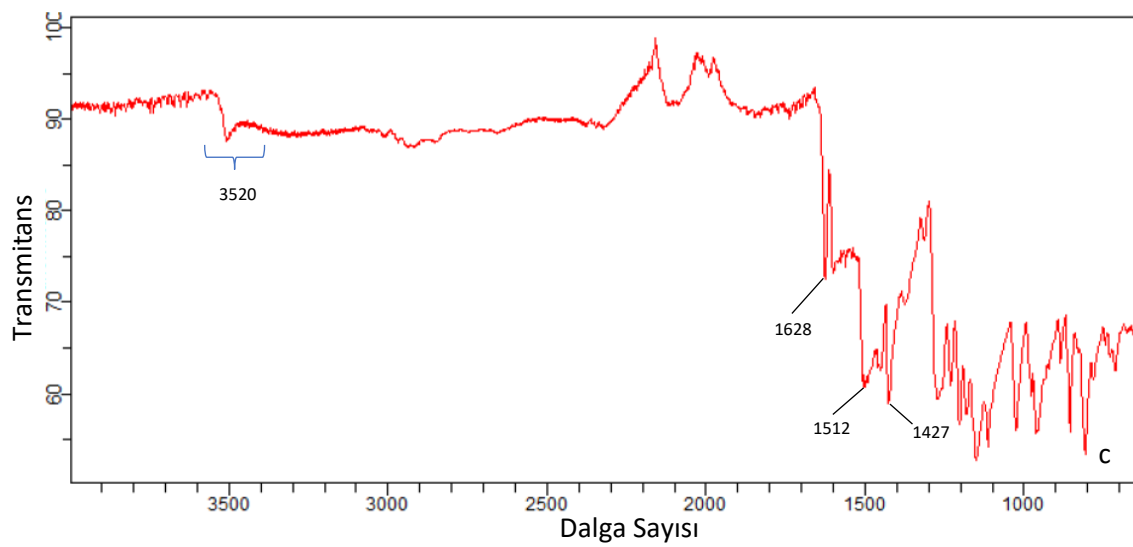
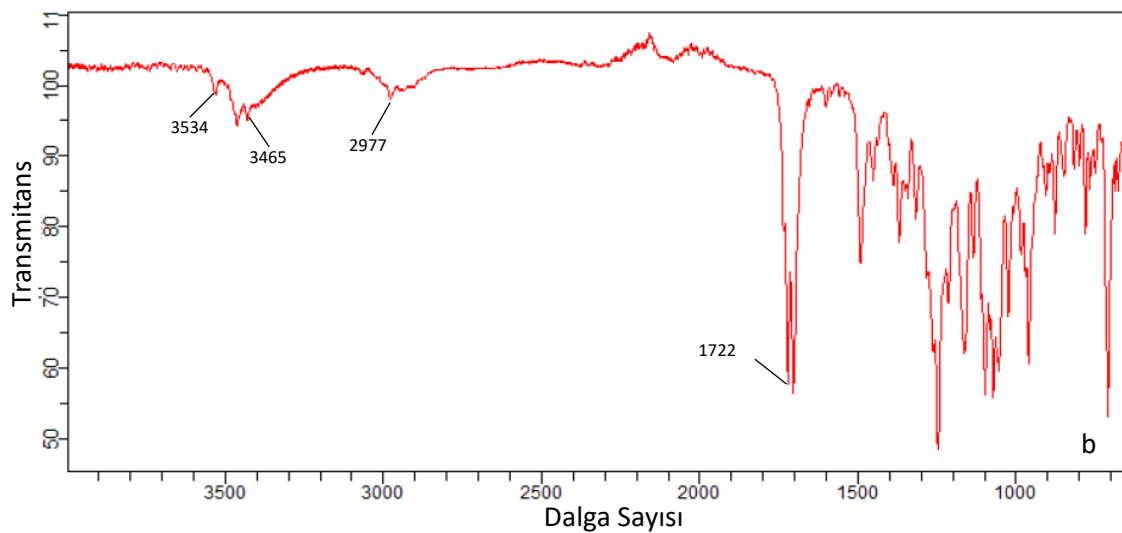
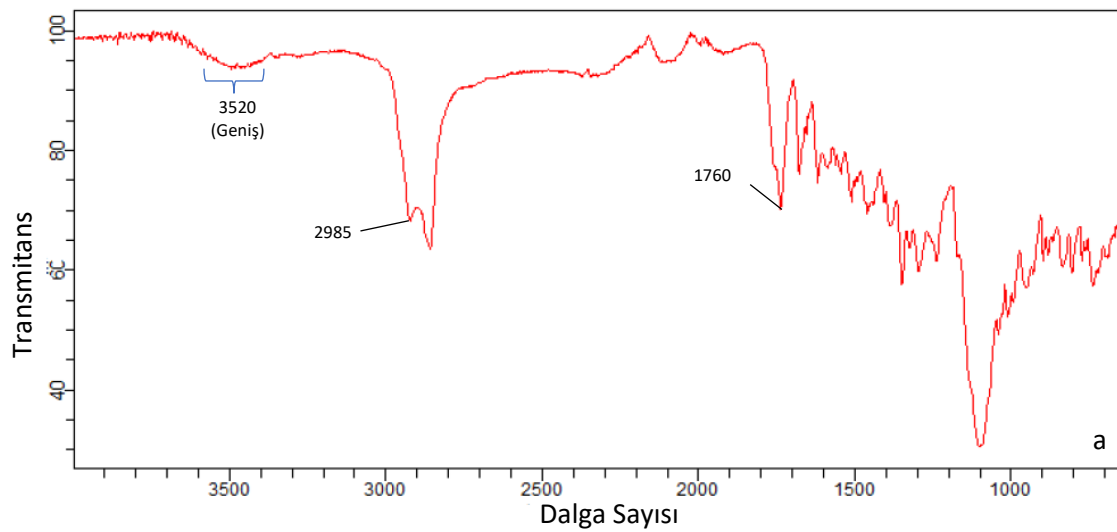
**Tablo 4.11.** Polisorbat 80 kaplama miktarları ile ilgili veriler

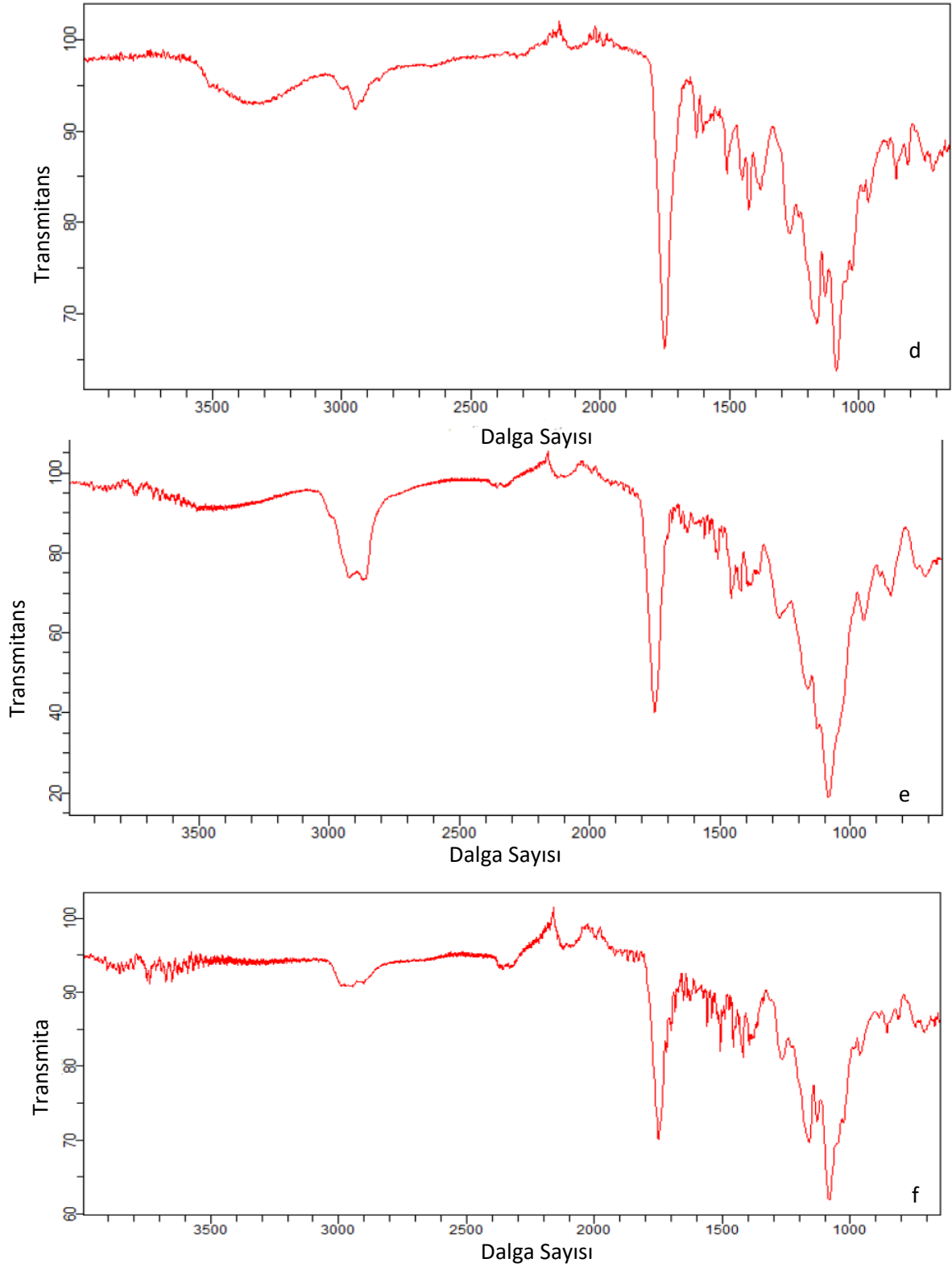
PLGA Türü	Absorbans (234 nm)	Adsorbe edilen polisorbat 80 miktarı (mg)	Kaplama miktarı (%)	Polisorbat 80/PLGA (mg/mg)
Asit Terminal	2,048 ± 0,01	9,3	%9,3	0,22
Ester Terminal	2,038 ± 0,01	9,7	%9,7	0,23

İki PLGA tipi arasında t-testi ile fark anlamsız ( $p < 0,05$ ) olup iki PLGA arasında polisorbat 80 kaplama miktarında herhangi bir fark olmadığını kanıtlanmıştır.

#### 4.5. Fourier Dönüştürülmüş Kızılötesi Spektroskopisi

Dosetaksel, kurkumin ve PLGA arasındaki kimyasal etkileşimi incelemek için dosetaksel, kurkumin, PLGA, dosetaksel-kurkumin-PLGA hammadde karışımı, dosetaksel-kurkumin yüklü PLGA NP ve polisorbat 80 kaplamalı dosetaksel-kurkumin yüklü PLGA NP FTIR spektrumları alınmıştır (Şekil 4.10.). Dosetaksel'in FTIR spektrumu OH grubu nedeniyle  $3534 \text{ cm}^{-1}$  ve NH esneme nedeniyle  $3465 \text{ cm}^{-1}$ , C = C esneme nedeniyle  $1447,08 \text{ cm}^{-1}$ , C = C esneme nedeniyle  $1722 \text{ cm}^{-1}$ , CH germe nedeniyle  $2977 \text{ cm}^{-1}$  ve  $702 \text{ cm}^{-1}$  absorbans göstermiştir.



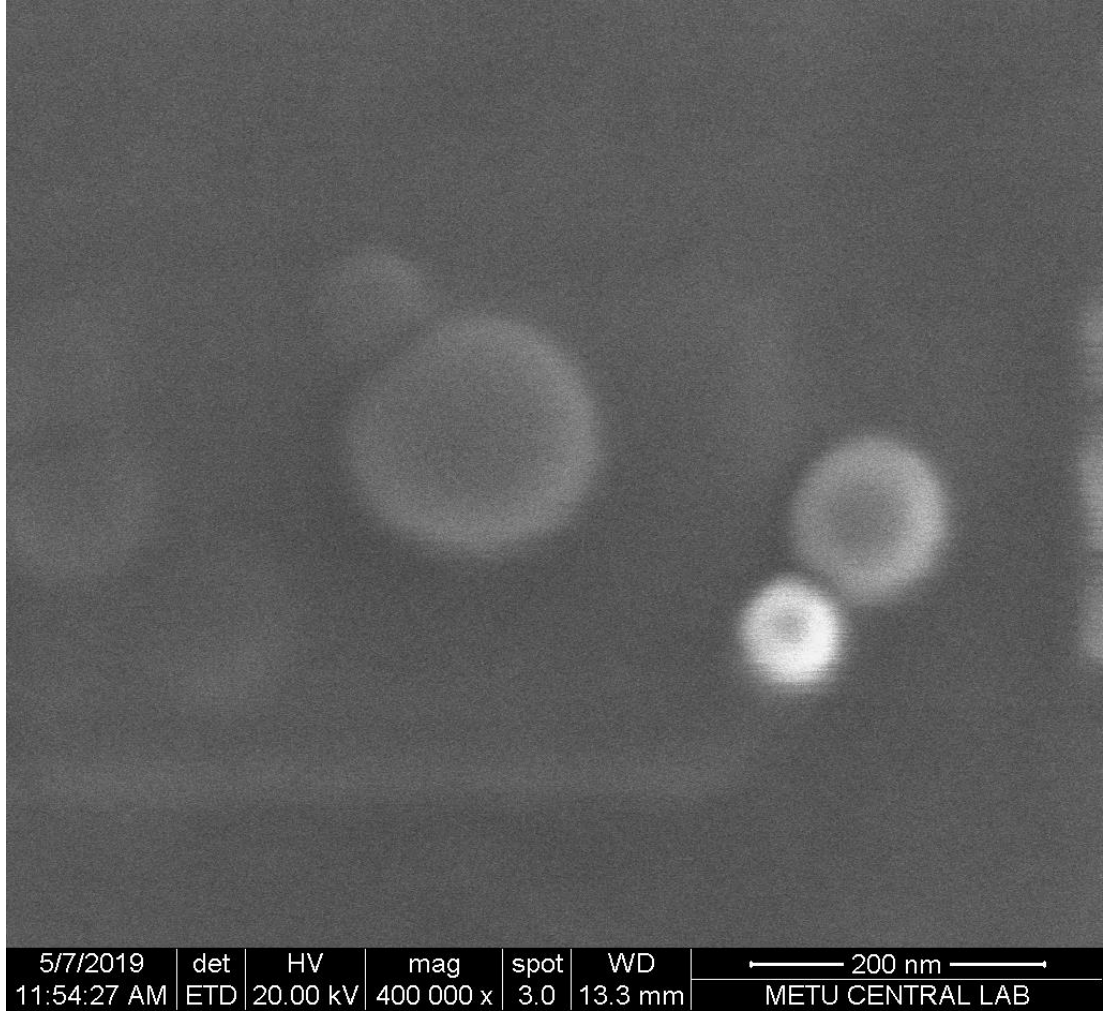


**Şekil 4.10.** FTIR spektrumları: a) PLGA, b) dosetaksel, c) kurkumin, d) dosetaksel-kurkumin-PLGA fiziksel karışımı, e) dosetaksel-kurkumin yüklü PLGA NP ve f) polisorbobat 80 kaplı dosetaksel-kurkumin yüklü PLGA NP

Kurkumin'in IR spektrumu, ağırlıklı olarak alkenlerin (C = C) ve karbonil (C = O) karakterinin örtüşen germe titreşimlerine bağlı 1628 cm<sup>-1</sup>'de germe titreşimlerini göstermiştir. O-H gruplarından dolayı 3200-3500 cm<sup>-1</sup>'de germe titreşimi, 1427 cm<sup>-1</sup>'de C = C aromatik germe titreşimi ve 1512 cm<sup>-1</sup>'de yüksek yoğunluklu bant karbonil grubu absorpsiyonları göstermiştir. Dosetaksel ve kurkumine ilişkin bu pikler herhangi bir kayma olmaksızın dosetaksel-kurkumin-PLGA fiziksel karışımında da gözlenmiştir. Kaplanmamış nanopartiküllerin ve polisorbitat 80 kaplı nanopartiküllerin FTIR spektrumları benzerdir. Bununla birlikte, O-H gerilmesine bağlı polisorbitat 80 kaplı nanopartiküllerin spektrumunda 3300-3600 cm<sup>-1</sup>'deki geniş bandının polisorbitat 80'in serbest hidroksil gruplarının varlığını göstermiştir. Dosetaksel, kurkumin ve PLGA spektrumlarında gözlenmemiş ancak nanopartiküllere ilişkin spektrumda gözlenen, dolayısıyla yeni bir fonksiyonel gruba ait olabilecek herhangi bir pik söz konusu olmadığından dosetaksel, kurkumin ve PLGA arasında kimyasal bir etkileşme olmadığı sonucuna varılmıştır.

#### **4.6.Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleme**

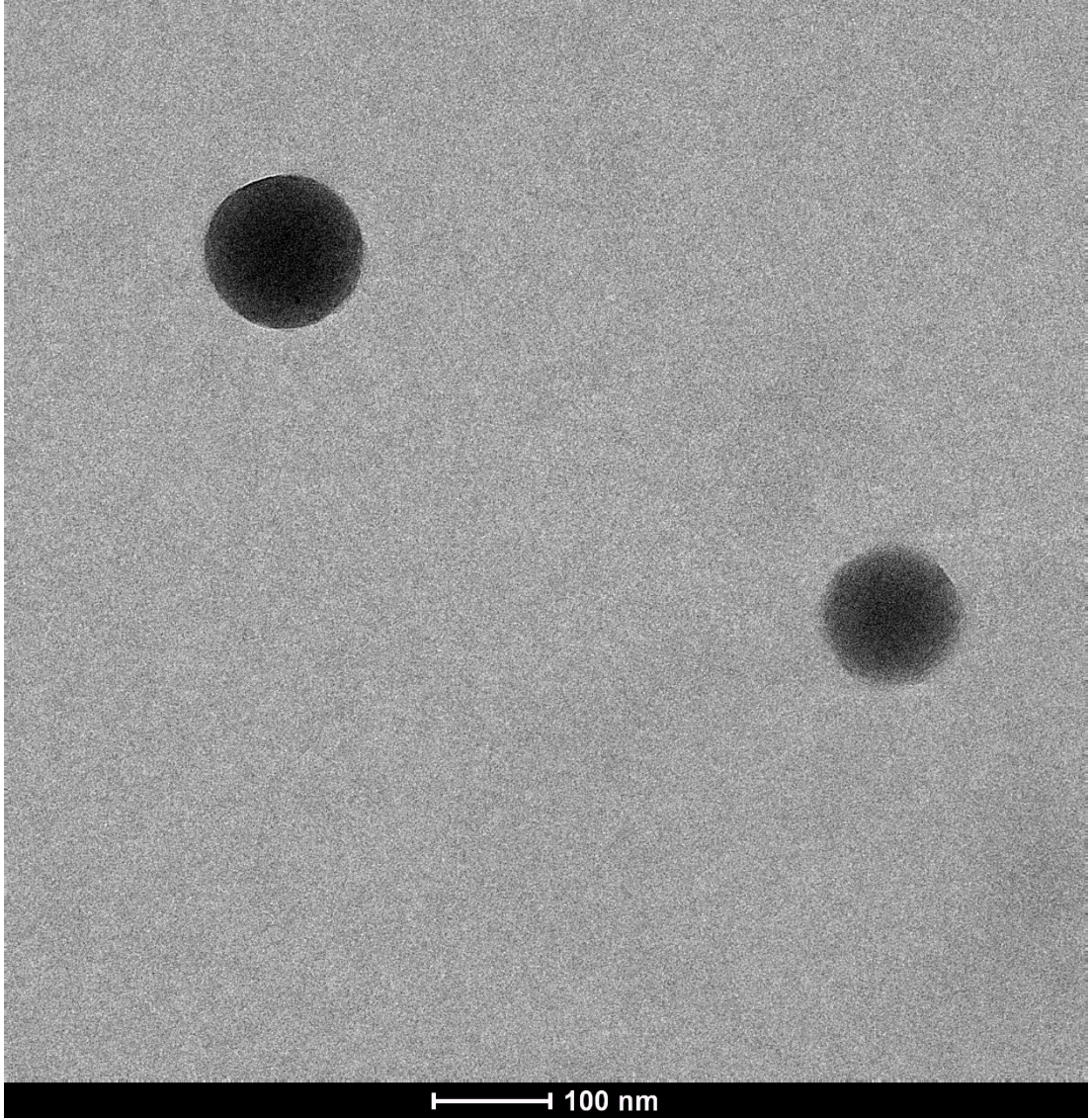
Geliştirilen nanopartiküllerde agregasyon olmadığı, homojen olarak dağıldığı, pürüzsüz yüzey ve küresel yapıda oldukları gösterilmiştir. Dinamik ışık saçılımı (DLS) ve TEM görüntüleri ile partikül büyüklüğü, homojenliğine ve şekil olarak benzerlik göstermiştir (Şekil 4.13.).



**Şekil 4.13.** Dosetaksel ve kurkumin yüklü nanopartiküllerin SEM görüntüsü

#### **4.7.Transmisyon Elektron Mikroskobu**

Partiküllerin şeklinin ve büyüklüğünün daha detaylı incelenmesi amacıyla DLS'e ek olarak TEM analizleri de gerçekleştirilmiştir. TEM görüntüleri literatürle uyumlu olarak küresel şekilde olup DLS ölçümlerine benzer şekilde nanopartiküllerin varlığını göstermiştir (Şekil 4.14.).



**Şekil 4.14.** Dosetaksel ve kurkumin yüklü PLGA nanopartiküllerin TEM görüntüsü



#### 4.8.Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Zeta Potansiyeli

Tez kapsamında, dosetaksel ve kurkumin yüklü PLGA nanopartikülerinin hazırlanmasında kullanılan solvan uçurma yönteminin sağladığı partikül büyüklüğü limitleri içerisinde en küçük partikül büyüklüğü ve PDI ve en yüksek ilaç enkapsülasyon etkinliği elde edilmesi hedeflenmiştir. Optimum formülasyondan elde edilen nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve PDI değerleri DLS yöntemi ile ölçüldü ve SEM ve TEM görüntüleri ile desteklenmiştir. Box-Behnken deney tasarımında ise partikül büyüklüğü sonuçları 106,1 nm ile 298,5 nm arasında bulunmuştur (Tablo 4.4.). Deney kapsamında elde edilen PDI değerleri dar aralığı (PDI: 0,033-0,185) partiküllerin homojen partikül büyüklüğü dağılımını göstermiştir (Şekil 4.6.). Optimum formülasyondan elde edilen partikül büyüklüğü, PDI Tablo 4.12.'de ve zeta potansiyeli Tablo 4.13.'de gösterilmiştir. CCM ve DTX yükleme, polisorbat 80 kaplama ve her iki birlikte NP parametre değerleri üzerinde etkileri sayısal olarak Tablo 4.12 ve Tablo 4.13.'de özetlenmiştir.

Partikül büyüklüğü ölçmek için parametre olarak Z-ortalama kullanılmıştır. Bu parametre ISO 13321 ve ISO 22412 standartlarına göre kalite kontrol parametresi olarak da kullanılabilir. Aynı zamanda harmonik instensite ortalama partikül çapı olarak da adlandırılmaktadır. F11, F15 ve optimum formülasyonların Z-ortalama ölçüm sonuçları Şekil 4.15.'te gösterilmiştir.



**Tablo 4.12.** Box-Behnken deney tasarımı kapsamında elde edilen optimum formülasyonun partikül büyüklüğü ve PDI verileri (n = 3). Polisorbat 80 ve ilaç enkapsülasyon ile meydana gelen partikül büyüklüğü ve PDI farkı özetlenmiştir.

Adı	Partikül büyüklüğü (nm)	Fark (nm)	PDI	Fark
Boş PLGA NP	128,9 ± 0,9	-	0,029 ± 0,014	-
CCM-DTX-PLGA NP	151,2 ± 1,6	22,3	0,057 ± 0,017	0,028
Poly80-Boş PLGA NP	145,4 ± 1,0	16,5	0,077 ± 0,010	0,048
Poly80-CCM-DTX-PLGA NP	163,7 ± 0,9	34,8*	0,090 ± 0,022	0,061*
		12,5 **		0,033**

\* Kaplama ve ilaç enkapsülasyondan meydana gelen fark.

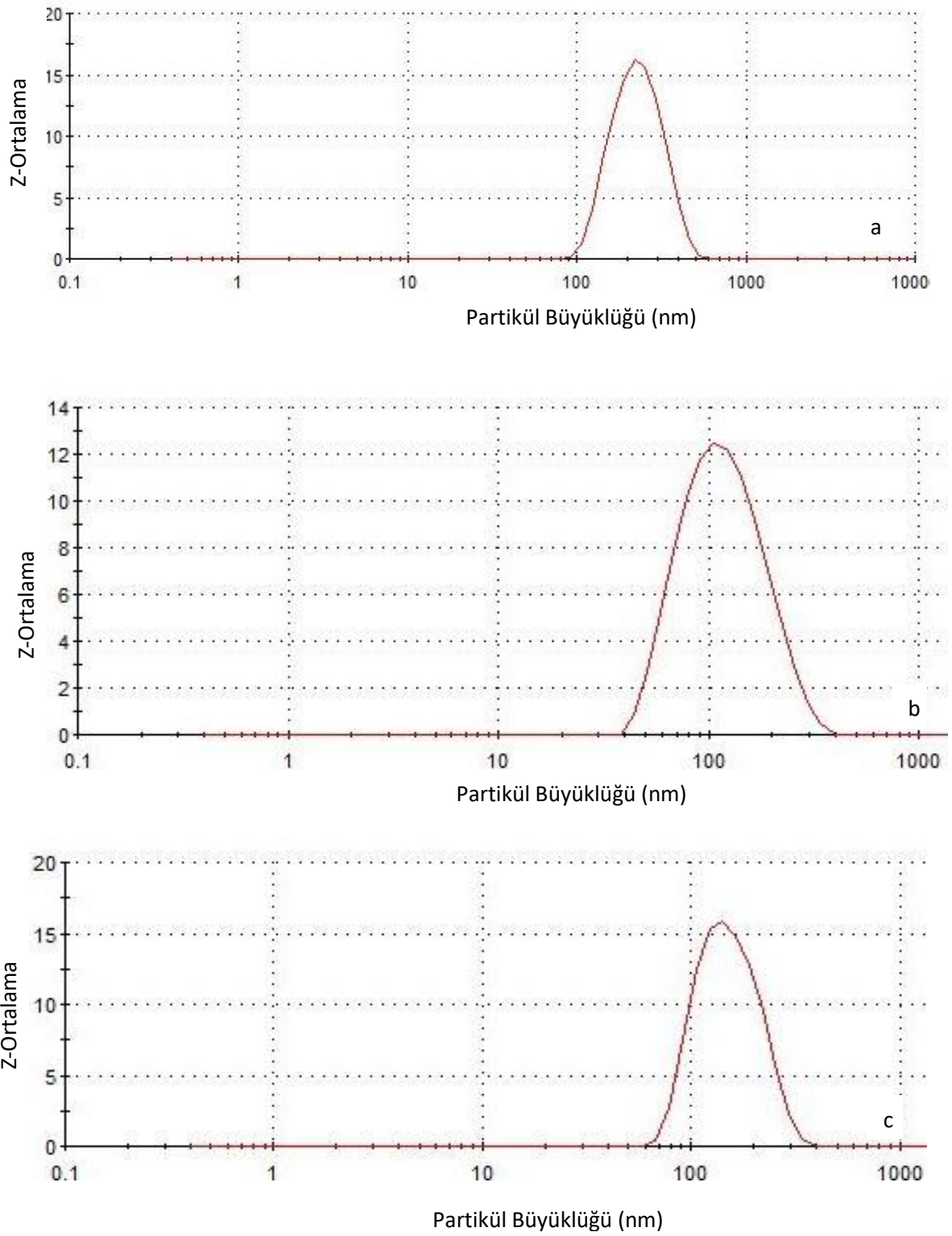
\*\* Kaplamadan meydana gelen fark.

**Tablo 4.13.** Box-Behnken deney tasarımı kapsamında elde edilen optimum formülasyonun zeta potansiyel verileri verileri (n = 3). Polisorbat 80 ve ilaç enkapsülasyon ile meydana gelen zeta potansiyel farkı özetlenmiştir.

Adı	Zeta Potansiyeli (mV)	Fark (mV)
Boş PLGA NP	-9,81 ± 0,57	-
CCM-DTX-PLGA NP	-13,67 ± 0,65	-3,87
Poly80-Boş PLGA NP	-9,68 ± 2,53	+0,13
Poly80-CCM-DTX-PLGA NP	-12,80 ± 2,53	-2,99*
		+0,87**

\*Kaplama ve ilaç enkapsülasyondan meydana gelen fark.

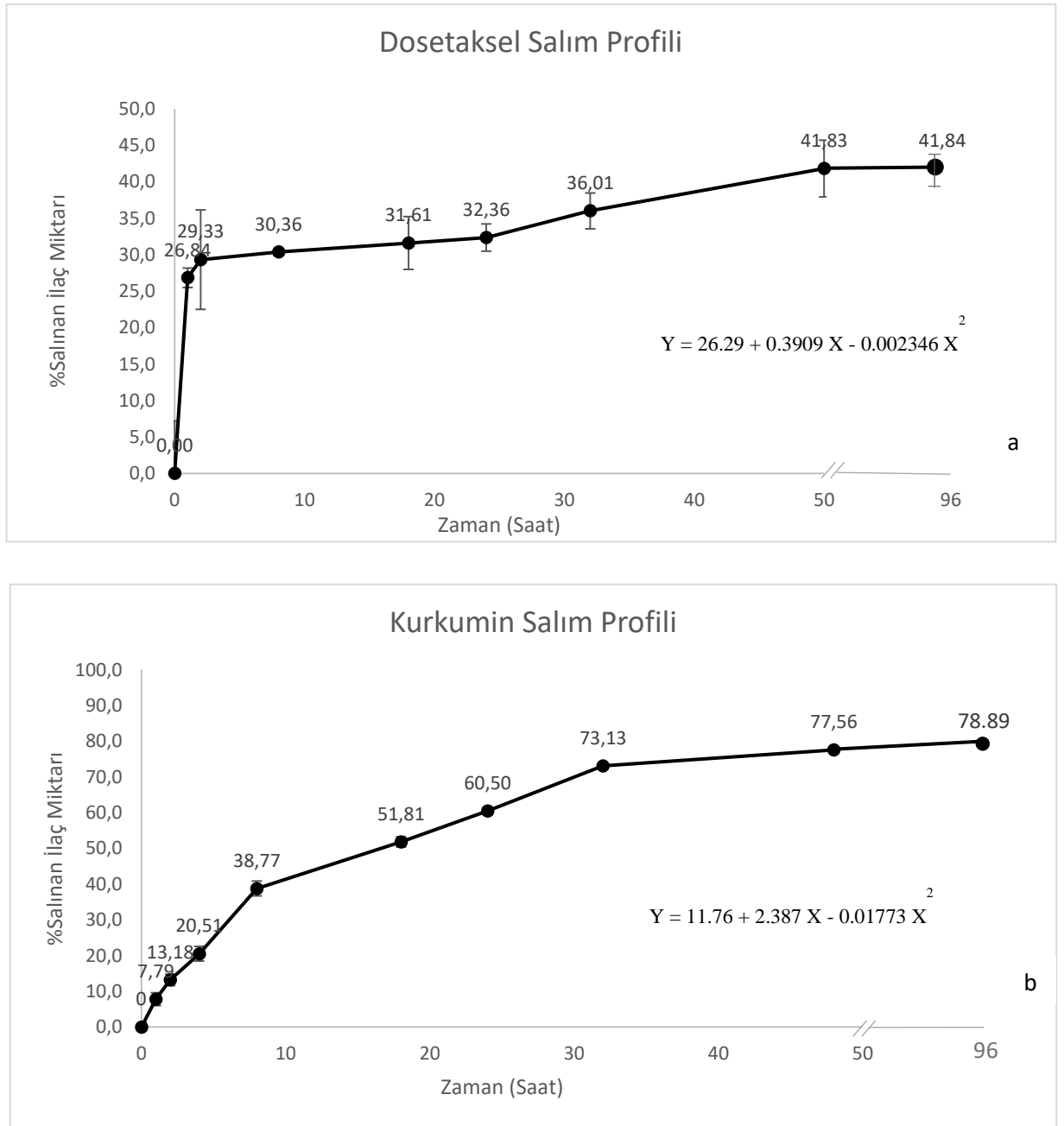
\*\* Kaplamadan meydana gelen fark.



Şekil 4.15. DLS ile ölçülen partikül büyüklüğü ve dağılımı a) F11 b) F15 ve c) Optimum Formülasyon

#### **4.9.*In Vitro* İlaç Salımı**

Box-Behnken deney tasarımı kapsamında elden edilen kurkumin-dosetaksel yüklü PLGA nanopartikülerin optimum formülasyonuna ilişkin in vitro kurkumin ve dosetaksel salım profilleri Şekil 4.16’te verilmiştir.



**Şekil 4.16.** Box-Behnken deney tasarımı kapsamında elden edilen kurkumin-dosetaksel yüklü PLGA nanopartikülerin optimum formülasyonuna ilişkin in vitro a) dosetaksel ve b) kurkumin salım profilleri

Dosetaksel ilk 2 saat boyunca hızlı bir salım söz konusu ve geri kalan 4 gün boyunca yavaş ve sürekli bir salım gözlenmiştir. Dosetakselin hızlı salımın sebebi olarak PLGA

yüzeyinde adsorbe edilen ilaç salımı olarak düşünülmektedir. Dosetaksel miktarının yaklaşık % 30'u polisorbata 80 kaplı NP'den 2 saat sonra ve yaklaşık % 42'si 96 saat sonra salındı, bu da bir yardımcı çözücü / yüzey aktif madde olan polisorbata - 80'in NP'lerden ilaç salınımını destekleyebileceğini göstermektedir (174). Polisorbata 80 kaplaması NP'lerin hidrofilik oranını arttırdığı için literatürde de belirtildiği gibi ilaç salımını arttırmaktadır (175). Dosetakselin geri kalanın salımı ise PLGA NP'lerin PLGA degradesyonu ile birlikte salım göstermektedir.

Kurkumin ise daha yavaş ve sürekli bir salım gözlenmiştir. 18. saate kadar kurkuminin %50'sinden fazla salınmıştır. Geri kalan kurkumin ise 4 gün boyunca daha yavaş olarak salınmıştır.

Hazırlanan CCM-DTX-PLGA NP'lerin CCM ve DTX salım profilleri, sıfır derece, birinci derece, Higuchi, Hixson and Crowell veya Korsmeyer Peppas modellerine uygunluk incelenmiştir. CCM salım profili  $Y = 11.76 + 2.387 X - 0.01773 X^2$  denklemi ile açıklanmıştır ve R<sup>2</sup> değeri 0.9652 (p < 0.05). Salım modeli olarak Korsmeyer Peppas modeline uymaktadır.

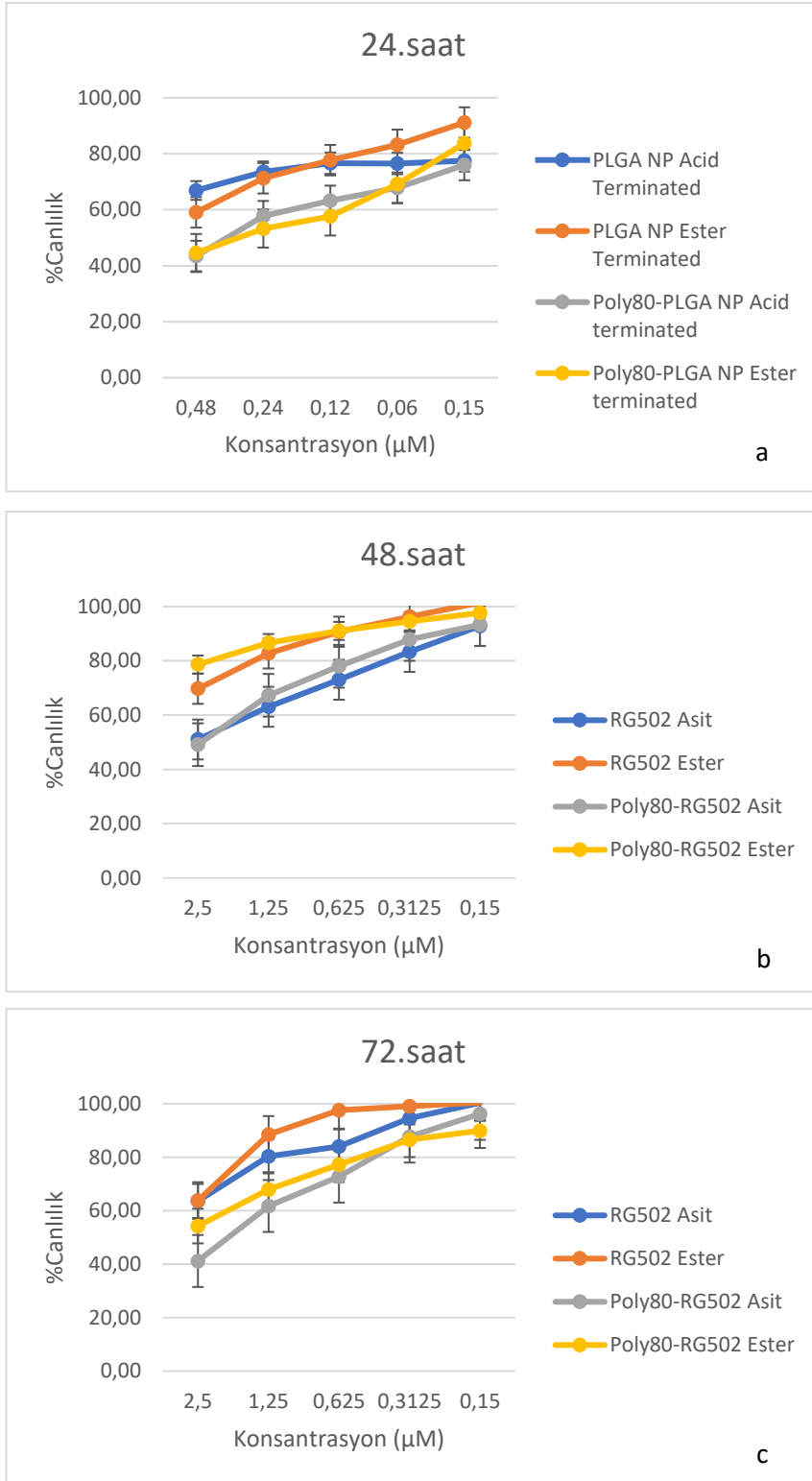
DTX salım profili  $Y = 26.29 + 0.3909 X - 0.002346 X^2$  denklemi ile açıklanmıştır ve R<sup>2</sup> değeri 0.9017 (p < 0.05). Salım modeli olarak Higuchi modeline uymaktadır.

#### **4.10. In Vitro Hücre çalışmaları**

##### **4.10.1. Dosetaksel ve Kurkumin İçermeyen PLGA Nanopartiküllerinin biyoyumluluklarının İncelenmesi**

İlaç endotel hücrelerine zarar vermeden KBB'yi aşır glioma hücrelerine toksisite göstermesine amaçlandığı için boş PLGA NP'ler sitotoksik olmamalıdır. Bu sebeple hem ester ucu hem de asit ucu olan boş PLGA NP'ler (polisorbata 80 kaplamalı ve kaplamasız) 24, 48 ve 72 saat boyunca bEnd.3 hücrelerindeki sitotoksisiteyi araştırılmış ve sonuçları Şekil 4.17.'de gösterilmiştir. Tüm hesaplamalar DTX-PLGA dönüştürme tablosuna göre yapılmıştır. IC 80 (Hücrelerin %80'ni öldürmek için

gereken DTX miktarı) üstünde boş PLGA NPler güvenli olarak değerlendirilmiştir ( $p < 0.05$ ). Asit uçlu boş PLGA NPler ester uçlu boş PLGA NPlere göre daha toksik bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Polisorbat 80, ester uçlu PLGA NPlerde sitotoksiteyi arttırmaktadır ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.17.** a) 24.saat, b) 48.saat ve c)72.saat asit uçlu boş PLGA NPler, ester uçlu boş PLGA NPler, polisorbitat 80 kaplamalı ve kaplamasız bEnd.3 endotel hücrelerinde sitotoksosite değerleri.

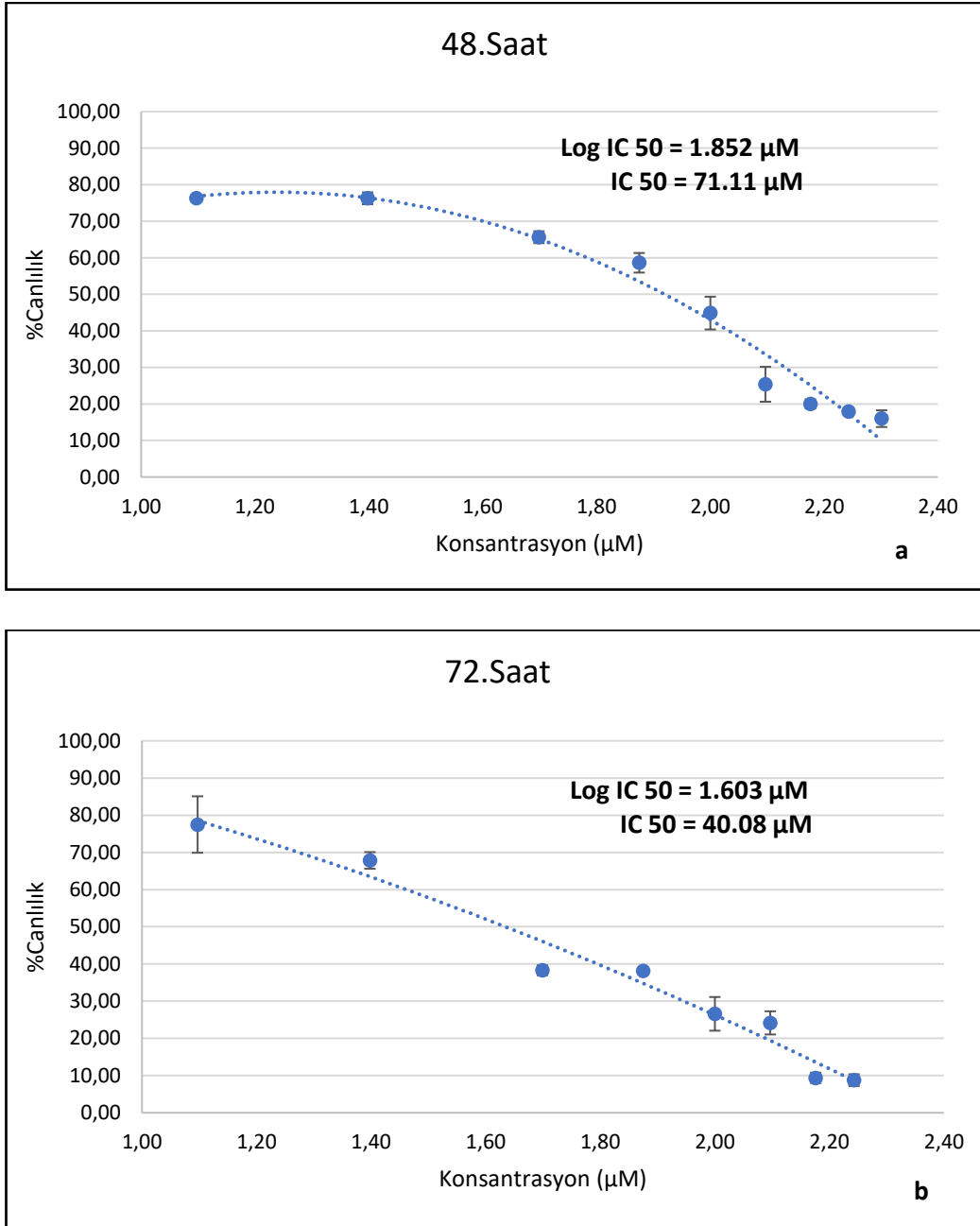
#### 4.10.2. Doseksel ve Kurkumin Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksitesilerinin İncelenmesi

Tez kapsamında araştırılmak istenen konularda biri, dosekselin tek başına ve kurkumin ile kombine şekilde U87 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisidir. Öncelikli olarak kurkumin ve doseksel çözeltilerinin U87 hücreleri üzerindeki sitotoksitesileri belirlenmiştir (Şekil 4.18.). Bunun için 12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150 ve 200  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda kurkumin ve 0.039, 0.078, 0.15, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10  $\mu\text{M}$  doseksel farklı sürelerde inkübe edilerek (24, 48, 72, 96, 120 ve 144.saatlerde) toksitesileri MTT yöntemi ile ölçülmüştür. Kurkumin için en yüksek sitotoksitesite değeri 72.saat inkübasyon sonrası bulunmuş ve IC 50 değeri 123.6  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Doseksel etkin mekanizmasından dolayı (sitostatik) 120.saatten sonra IC 50 değeri hesaplanabilmiş ve 0.0054  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur (Şekil 4.19. ve Şekil 4.20.).

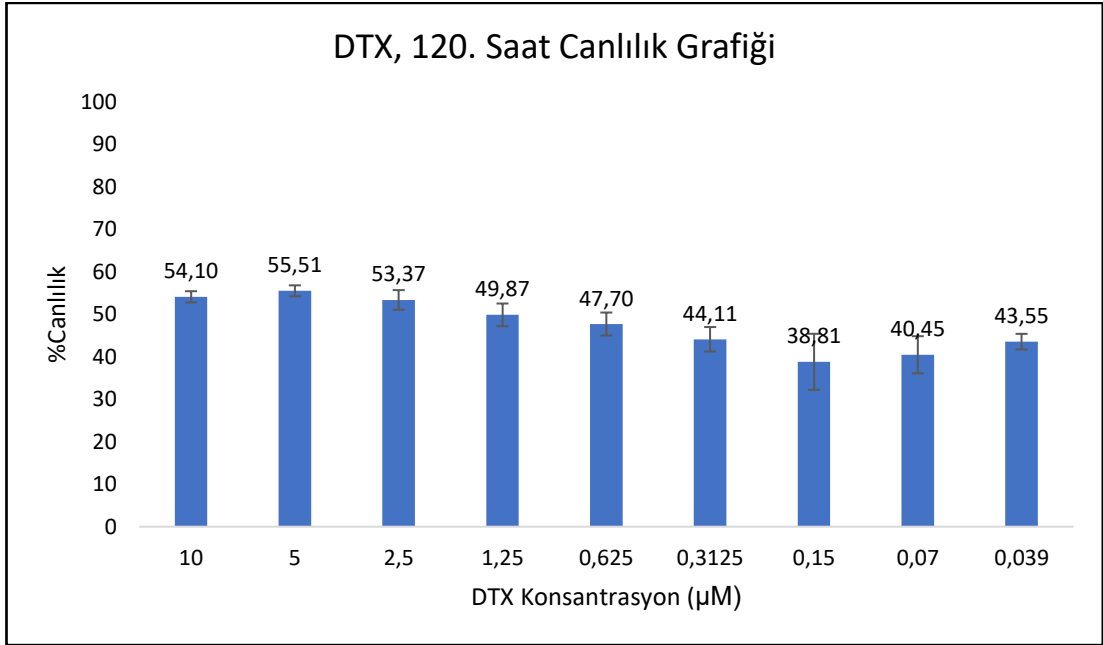
Doseksel:kurkumin en uygun oranını tespit etmek için DTX 0.07  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda sabit tutmuş, kurkuminin ise 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  ve 75  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında ortama eklenerek U87 hücrelerinde MTT yöntemi ile 72.saatte sitotoksitesileri ölçülmüştür. Sonuçlar Şekil 4.21.'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlarda konsantrasyona bağlı olarak kurkumin U87 hücrelerinde dosekselin sitotoksitesitesi belirgin olarak arttırdığı bulunmuştur. 25  $\mu\text{M}$  ve 50  $\mu\text{M}$  kurkumin konsantrasyonları arasında sitotoksitesilerde anlamlı bir fark ( $p > 0.05$ ) gözlenmemiştir. Kombine halde ilaç uygulandığında 0.07  $\mu\text{M}$  doseksel + 50  $\mu\text{M}$  kurkumin ve 0.07  $\mu\text{M}$  doseksel + 75  $\mu\text{M}$  kurkumin arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).

Kurkumin ve doseksel yüklü PLGA NP U87 hücrelerindeki sitotoksitesite sonuçları Şekil 4.22.'de gösterilmiştir. Burada elde edilen sonuçlarda, kurkumin ve dosekselin tek başına enkapsüle edildiği NP'lere göre kombine ilaç içeren NP'lerin sitotoksitesitesi çok daha yüksek bulunmuştur. 75  $\mu\text{M}$  kurkumin 50  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları arasında kombine halindeyken anlamlı bir fark olmadığı için deneyden çıkarılmıştır.

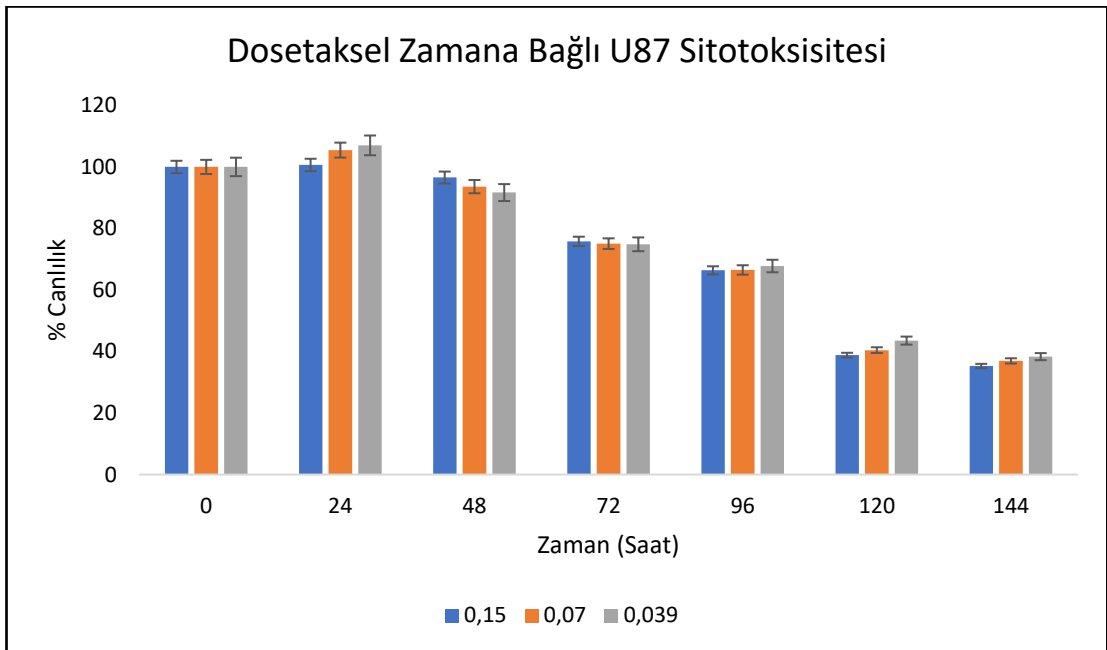




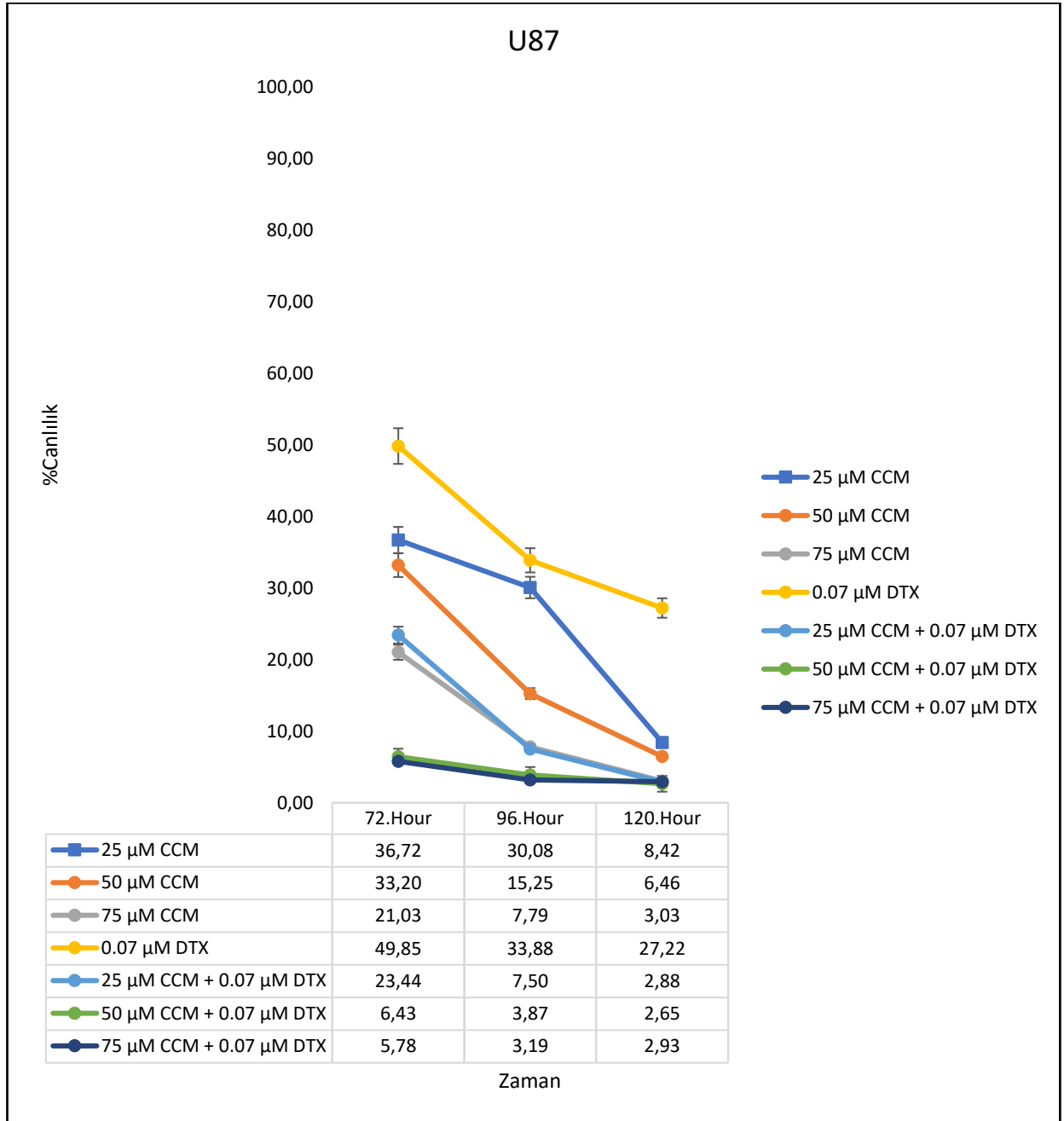
**Şekil 4.18.** Kurkumin çözeltinin U87 hücre hatı **a)** 48.saat ve **b)** 72.saatlerde sitotoksosite



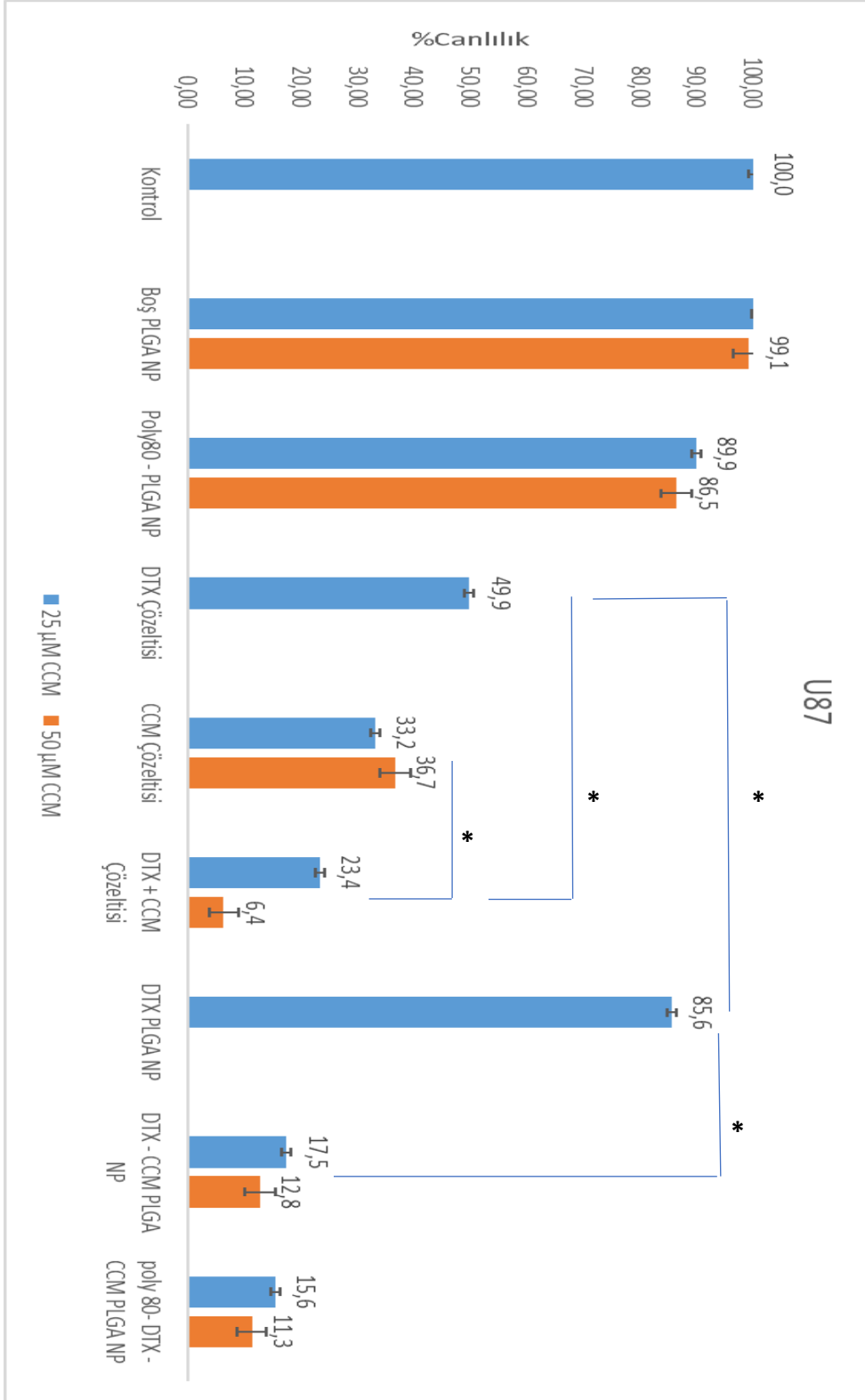
**Şekil 4.19.** Dosetaksel çözeltinin U87 hücre hatı 120.saatte sitotoksiste sonuçları



**Şekil 4.18.** Zamana bağlı dosetaksel U87 hücrelerde sitotoksiste değişimi



**Şekil 4.21.** Dosetaksel ve kurkumin farklı oranlarda sitotoksisite değerleri

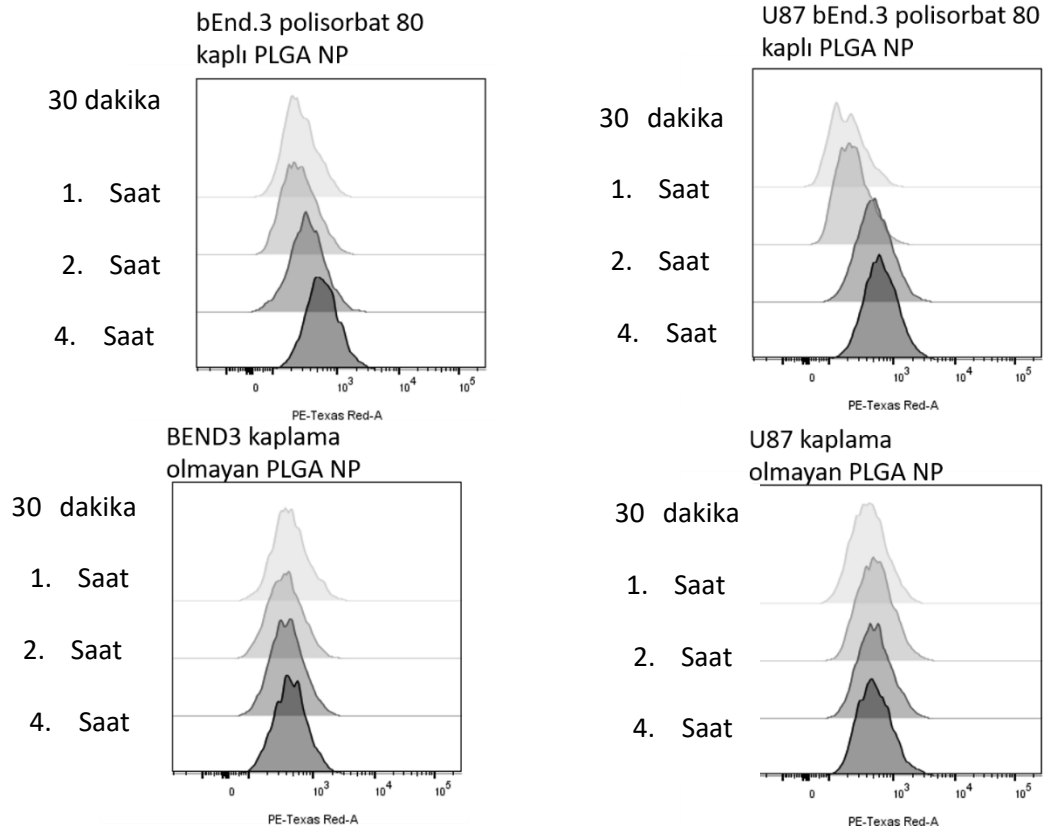


**Şekil 4.22.** Dosetaksel ve kurkumin yüklü PLGA Nanopartiküller sitotoksosite değerleri

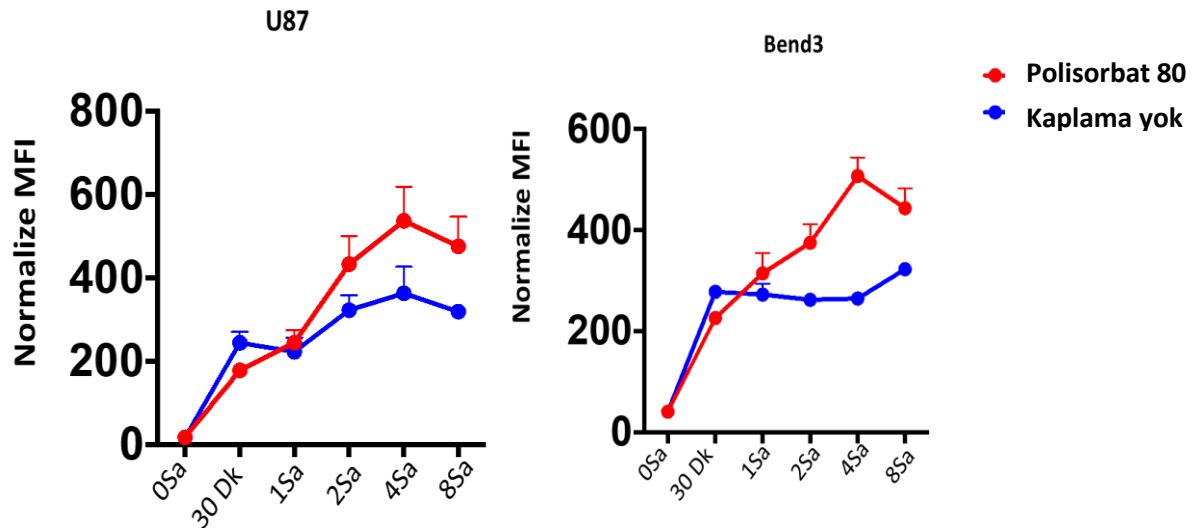
### 4.10.3. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımlarının İncelenmesi

Floresan özelliği ve hidrofobik özellikte olmasından dolayı tercih edilen nil kırmızı PLGA NP'lere enkapsüle edilen nanopartikül formülasyonlarının hücre içine alımları hem akım sitometri hemde floresan mikroskop kullanılarak bEnd.3 ve U87 hücre hatlarında incelenmiştir.

Akım sitometri çalışmaları için polisorbat 80 kaplamalı ve kaplamasız PLGA NP formülasyonları 30 dk, 1,2, 4 ve 8 saat inkübasyon sonrası nicel olarak hücre içine alım miktarları tayin edilmiştir. Alım miktarları karşılaştırılırken hücrelerin ortalama floresan yoğunluğu (MFI) ölçülmüştür. Sonuçlar U87 ve bEnd.3 hücre hatları için Şekil 4.23. ve 4.24.'de gösterilmiştir.

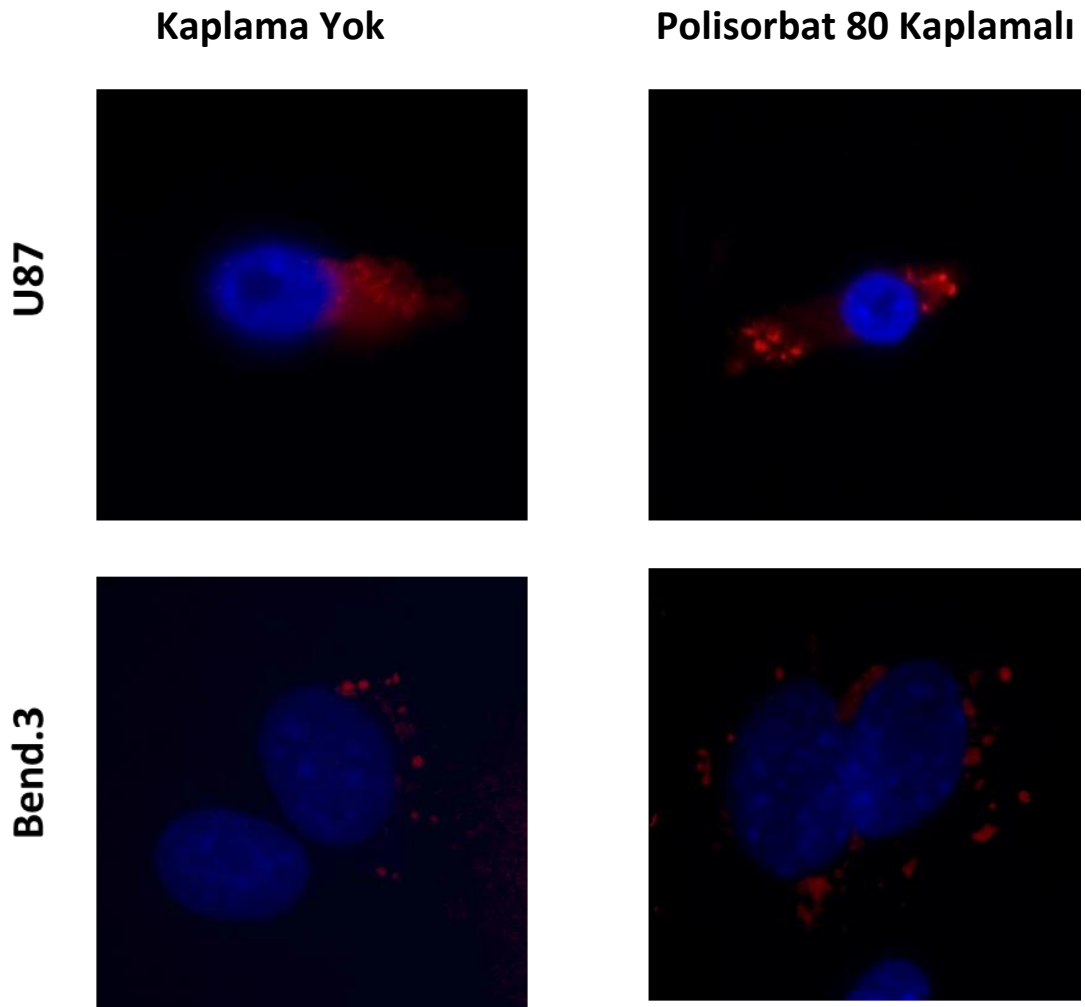


**Şekil 4.23.** U87 ve bEnd.3 hücrelerinde polisorbate 80 kaplı ve kaplama olmayan PLGA NP'lerin ortalama floresan yoğunluklarına histogram sonuçları.



**Şekil 4.24.** a) U87 ve b) bEnd.3 hücrelerinde kaplı ve kapsız PLGA NP'lerin ortalama floresan yoğunluklarına göre hücreye alım grafikleri.

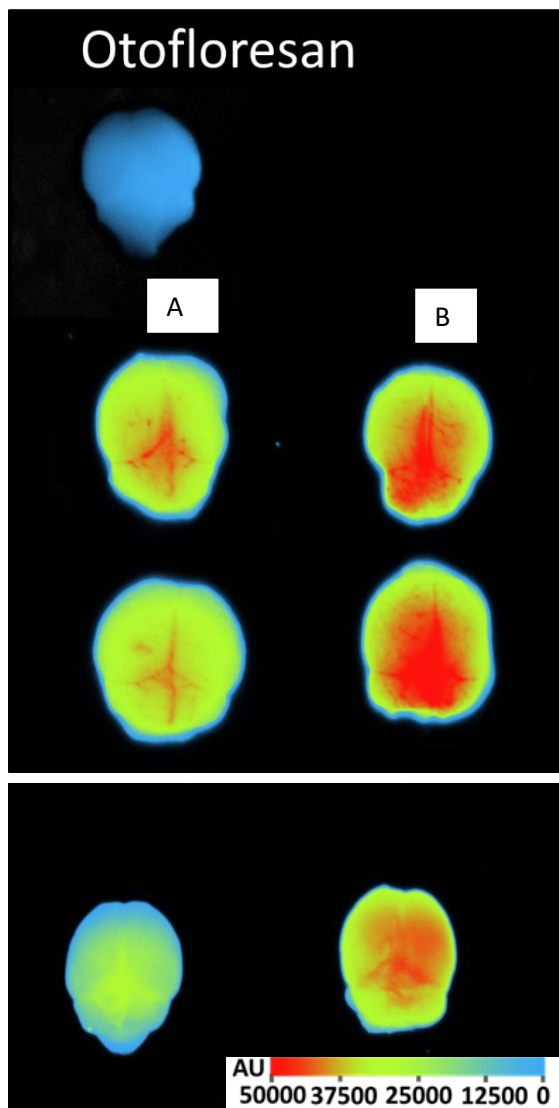
Formülasyonların akım sitometri ile nicel olarak hücre içine alım miktarları tespit edildikten sonra, bu sonuçlar göz önünde bulundurularak formülasyonların 4 saat inkübasyonu sonrası floresan mikroskobu ile görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Nanopartiküllerin hücrenin hangi bölgesinde lokalize olduğunun belirlenmesi amacıyla hücre çekirdekleri DAPI ile boyanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.25’de gösterilmiştir. Nil kırmızısı ile yüklü partiküllerin çoğunlukla hücrenin sitoplazmasında bulunduğu gözlemlenmiştir. Floresan ışımının polisorbata 80 kaplamalı PLGA NP’lerde akım sitometredeki sonuçları destekleyerek şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.



**Şekil 4.25.** bEnd.3 ve U87 hücre hattına uygulanan polisorbata 80 kaplamalı ve kaplamasız formülasyonların kırmızı ve mavi kanaldaki görüntüleri ile bu görüntülerin birleştirilmiş halleri.

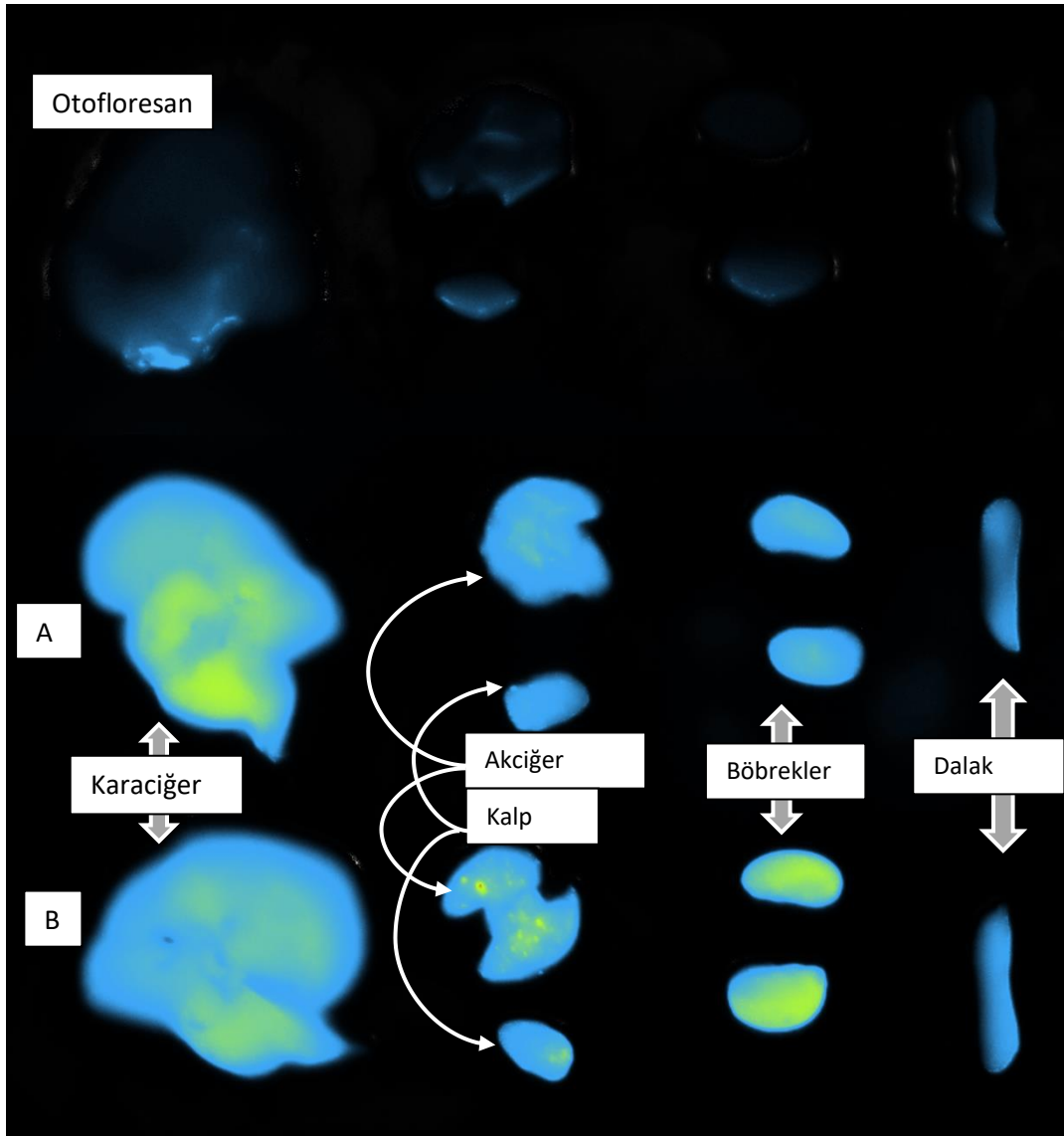
#### 4.11. *In Vivo* Çalışmalar

2 saat sonunda kaplı kapsız, kaplı ve otodloresan gruplarındaki farelere ait organlarının (Beyin, karaciğer, akciğer, kalp, böbrekler ve kalp) in vivo görüntüleme sisteminde verdikleri floresan intesite değerlendirildiğinde; polisorbata 80 ile kaplanmış nanopartiküllerin intensitelerinin kaplanmamış nanopartiküllere göre daha yoğun olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.26). Diğer organlar incelendiğinde ise polisorbata 80 ile kaplı olmayan nanopartiküllerin karaciğerde daha fazla yoğunlaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.27).



**Şekil 4.26.** 2. saatin sonunda kaplı ve kapsız nanopartiküllerin beyin intensitelerinin karşılaştırılması. A) polisorbata 80 kaplanmamış flamma 774 yüklü PLGA NP ve B) polisorbata 80 kaplı flamma 774 yüklü PLGA NP (n = 3).





**Şekil 4.27.** 2. saatin sonunda kaplı ve kaplamasız nanopartiküllerin biyodağılımları. A) polisorbata 80 kaplamasız flamma 774 yüklü PLGA NP ve B) polisorbata 80 kaplı flamma 774 yüklü PLGA NP.

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Kurkumin ve Dosetaksel Etkin Maddelerin Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyonu

Tez kapsamında olan dosetaksel ve kurkumin fizikokimyasal ve spektral özellikler bakımında birbirinden farklıdır. Ultraviyole (UV) ve görünür bölge (GB) dalga boylarında spektrumları incelendiğinde dosetaksel ve kurkumin maksimum absorbans verdiği dalga boyu sırasıyla 230 nm ve 425 nm'tir. Kurkumin UV bölgesinde çok az absorbans verirken dosetaksel GB dalga boylarında absorbans vermemektedir, bu sebeple miktar tayini yöntemi geliştirilirken iki ayrı analitik yöntem geliştirilmek zorunda kalmıştır. Dosetaksel miktar tayini için Avrupa Farmakope 9.0 (EP 9.0) monografı incelenmiştir. Monografında yer alan gradient bir HPLC analitik yöntemi yerine isokratik ve analiz süresi daha kısa olan bir yöntem geliştirilmiştir. Analitik yöntem validasyonu ICH Q2 kılavuzuna uygun değerlendirme parametrelere göre yapılmıştır.

Kurkumin miktar tayini ise nispeten daha zor ve karmaşıktır. Kurkumin ve diğer iki türevini öncelikle ayırması ve sonra miktar tayini yapılması gerektiği için UV absorbsiyon yerine HPLC-UV yöntemi seçilmiştir. Kurkumin yapısında bulunan metoksi grupların sayesinde C-18 kolonunda daha fazla tutunarak diğer türevlere göre daha uzun tutunma süresine sahiptir. Başarılı bir şekilde ayırdıktan sonra analitik yöntem validasyonu ICH Q2 kılavuzuna uygun değerlendirme parametrelere göre yapılmıştır.

### 5.2. Dosetaksel ve Kurkumin Yüklü Nanopartiküllerinin Optimizasyonu: Box-Behnken Deney Tasarımı

Geleneksel formülasyon geliştirme çalışmalarındaki çok önemli bir dezavantaj, her bir deneyde yalnız bir faktörü değiştirip diğer faktörler sabit kalması

gerekliliğidir. Dolayısıyla deney sayısı ve maliyeti yükselir ve faktörler arası etkileşimler de incelenememektedir. Daha fazla faktör kapsayarak deney sayısını düşürmek için literatürde birçok yöntem bulunmaktadır (166, 176). Kritik parametreler belirlenmiş olmasından dolayı, ana amacımız formülasyon faktörlerin kritik parametreler üzerindeki etkilerinin matematiksel olarak anlaşılması ve nihayetinde formülasyon optimizasyonudur. Bu sebeplerden ötürü formülasyon optimizasyonu ikinci dereceden etkileşimleri ve üçten fazla bağımsız değişken ile çalışıldığında daha az deneme ile sonuç alınabildiği için Box-Behnken yöntemi seçilmiştir. Yapılan önçalışmalar ve literatür araştırması ile bağımsız değişken ve değerlerine karar verilmiştir. Bağımsız değişkenler ve 3 farklı seviye değerleri (düşük, orta ve büyük olmak üzere) Tablo 3.3.'te verilmiştir. Sabit olarak tutulan değerler ve proses parametreleri Tablo 3.4.'te özetlenmiştir. Her bir formülasyonda su miktarı sabit tutularak *batch* büyüklüğü aynı büyüklükte sabitlenmiştir. Yukarıda bahsedilen değerleri belirterek minitab 17<sup>®</sup> kullanılarak olası 15 formülasyon oluşturulmuştur (Bkz. Tablo 3.5.). Formülasyonları değerlendirmek için bağımsız değişken olarak minimum partikül büyüklüğü ve polidispersite (PDI) ve maksimum kurkumin enkapsülasyon etkinliği kullanılmıştır. Dosetaksel enkapsülasyon etkinliğinin formülasyon optimizasyonu için değerlendirilmemesinin sebebi, dosetakselin düşük miktarda kullanılması ve önçalışma sonuçlarında bağımsız değişkenler üzerine anlamlı bir değişiklik oluşturmamasıdır. Zeta potansiyeli de aynı şekilde, kurkumin, dosetaksel ve PLGA miktarların değişikliklerine göre anlamlı bir fark olmadığı için önçalışmalarda gösterilmiştir. 15 formülasyondan elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesinde ve bağımsız değişken-bağımlı değişken arasındaki etkileşimleri göstermek için Minitab yazılımı yardımı ile her bir bağımsız değişken için denklem oluşturulmuştur. A, B ve C bağımsız değişkenlerin Y1, Y2 ve Y3 cevaplarını tanımlayabilme korelasyon olarak (model uyumu) R2 değerleri ile değerlendirilerek partikül büyüklüğünü ve PDI değerlerinden oluşturulan model ile anlamlı bir şekilde uyumlu iken kurkumin enkapsülasyonu ise uyumsuz olduğu ortaya çıkmıştır. Faktörlerin ana etkileri değerlendirildiğinde kurkumin ve dosetaksel yüklü nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve PDI üzerinde en anlamlı etkiye sahip faktörler sırasıyla yağ/su oranı, PLGA konsantrasyonu ve kurkumin konsantrasyonu olmuştur. Kurkumin konsantrasyonunun partikül büyüklüğü üzerindeki etkisi

anlamsız olarak değerlendirilmiştir ( $p > 0,05$ ). İstenilen partikül büyüklüğü ve PDI değerlerine ulaşabilmek için hedef fonksiyonu kullanılmıştır. Hedeflenen değerler yağ/su oranı, kurkumin konsantrasyonu ve PLGA konsantrasyonu için sırasıyla 0.11ml/ml, 5 mg/ml ve 47 mg/ml olarak belirlenmiştir. Bu değerlere göre minitab istatistiksel yazılımı kullanılarak optimum formülasyon elde edilmiştir (Bkz. Tablo 4.6.). Yazılım aracılığı ile tahmin edilen ve deney ile bulunan değerler (151,2-144,1 nm ve 0,057-0,063) arasında hata yüzdesi partikül büyüklüğü ve PDI değerleri için sırasıyla %4.93 ve %9.52 olarak hesaplanmıştır.

### **5.3. Dosetaksel-Kurkumin Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu**

Tez kapsamında geliştirilen dosetaksel-kurkumin yüklü PLGA NPler, etkin maddeler hidrofobik özellikte oldukları için primer emülsiyon hazırlama yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Formülasyon bileşenleri literatür ve önçalışma sonucunda organik faz olarak su ile karışabilen etil asetat, NP polimeri olarak biyoyumlu PLGA ve emülsifiye edici ajan olarak PVA seçilmiştir. poli(laktit-ko-glikolit) (PLGA) bazlı nanopartiküller, biyoyumluluğu, düşük toksisitesi ve yüksek hidroliz oranları nedeniyle seçilmiştir (177). Uniform boyut dağılımına sahip, küçük boyutlu NP oluşmasından kaynaklanan ve NP emülsiyonu üzerinde mükemmel stabilize edici özelliklere sahip emülsiyonları stabilize etmek için yaygın olarak kullanılan iyonik olmayan sürfaktan poli(vinil alkol) (PVA) seçilmiştir (178). PVA konsantrasyonunun NP karakterizasyon özellikleri üzerindeki etkileri daha iyi anlaşılabilmesi için, yapılan önçalışmada farklı konsantrasyonlarda PVA kullanılarak NP karakterizasyonu yapılmıştır. En yüksek olarak seçilen %1 PVA konsantrasyonunda partikül büyüklüğü nispeten daha yüksek bulunmasına rağmen PDI değerleri daha düşük ve stabiliteleri daha yüksek bulunmuş ve bu durumun literatür bilgiler ile uyumlu olduğu saptanmıştır(179). Etil asetat, oldukça tekrarlanabilir boyutlara sahip ve nispeten dar polidispersite indeksine sahip PLGA NPler hazırlandığı için seçilmiştir (179, 180). Primer emülsiyonun oluşması için ultrasonik prob ile ses dalgaları kullanılmıştır. Ses dalgalarının gücü, süresi ve aralıkları NP karakterizasyon değerlerini etkilemektedir.

Önçalışma ve literatür araştırması sonucu, ses dalgalarının gücü düşük, süresinin yüksek ve fazla aralıklarda olması PLGA bozulma riskini en düşük seviyeye düşürdüğü, partikül stabilitesini arttırdığı ve PDI değerini düşürdüğü saptanmıştır(181).

### **Partikül büyüklüğü, Morfolojisi ve Zeta Potansiyeli**

Box-Behnken optimizasyon çalışmalarında elde edilen bütün ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite ve zeta potansiyeli verileri DLS analizi ile gerçekleştirilmiştir. Optimum boş PLGA NP formülasyonunun partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri sırasıyla 128.9 nm, 0.029 ve -9.81 mV iken dosetaksel ve kurkumin eklenince 151.2 nm, 0.057 ve -13.67 anlamlı bir artış ( $p < 0.05$ ) gözlemlenmiştir. CCM ve DTX yüklenmesi partikül büyüklüğünü arttırarak çok düşük bir değerde bile olsa bir miktar agregasyon göstergesi olarak PDI değeri de artmıştır (182). DLS analizlerinden sonra yüzey morfolojisini incelemek için SEM ve partikül boyutu ve şeklini incelemek için TEM görüntüleri alınmıştır. SEM ve TEM analizlerden elde edilen görüntülerde NP yüzey ve şekli küreseldir. Ancak partikül büyüklükleri, DLS sonuçlara kıyasla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. DLS söz konusu olduğunda, teorik olarak, bir partikül sıvı bir ortamdan geçtiğinde, çözücünün ince bir elektrikli dipol katmanının yüzeyine yapıştığını belirtmektedir. Bu katman, partikülün ortamdaki hareketini etkiler. Bu nedenle hidrodinamik çap, herhangi bir kaplama malzemesi ve partiküle bağlanan çözücü tabakası ile birlikte brownian hareketinin etkisi altında nanopartikül hakkında bilgi vermektedir. SEM ve TEM ise doğrudan partikülün öngörülen alan çapı hakkında bir tahmin etmektedir. SEM ve TEM ile boyutu tahmin ederken, bu hidrasyon tabakası mevcut değildir, bu nedenle sadece partikül hakkında bilgi alınmaktadır. PLGA NPlerin etrafında oluşan hidrasyon tabakasından dolayı DLS analizi ile elde edilen NP boyutu SEM/TEM görüntülerden daha büyüktür. Benzer sonuç ve yorumlar literatürde bulunmaktadır (183, 184). DLS analizinde nanopartiküllerin sıvıdaki davranışına göre bir partikül büyüklüğü ölçüm yapıldığı için biyolojik sıvılardaki davranışını ve hareketlerini daha iyi temsil edebildiği düşünülmektedir.

Polisorbat 80 kaplama işleminden sonra, boş ve dosetaksel-kurkumin yüklü PLGA nanopartikül boyutlarında sırasıyla 16.5 nm ve 12.5 nm anlamlı ( $p < 0.05$ ) bir artış gözlemlenmiştir (Bkz. Tablo 4.12.) . Polisorbat 80 kaplama işleminden sonra, boş ve dosetaksel-kurkumin yüklü PLGA nanopartikül zeta potansiyelleri sırasıyla +0.13 mV ve +0.87 mV istatistiksel olarak anlamsız ( $p > 0.05$ ) bir artış gözlemlenmiştir (Bkz. Tablo 4.13.) . Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyelindeki değişim polisorbat 80 kaplamanın gerçekleştiğinin göstergelerinden biri olarak düşünülmektedir.

### **Polisorbat 80 Kaplama ve Miktar Tayini**

Pasif tümör hedeflendirme stratejilerini geliştirmek için, PLGA bazlı NP'lerin dış yüzeyi çeşitli kaplamalar materyaller denenmiştir. Kandaki kalış süresini uzatmak için Polisorbat 80, PEG ve poloksamerler gibi hidrofilik polimerler ile PLGA NP'lerinin yüzeyi kaplanmaktadır. NP'ler üzerindeki bu hidrofilik moleküller gizli (*stealth*) özellikler kazandırarak, retiküloendotelial sistem (RES) tarafından fagositik alımdan kaçınılmasına ve sistemik dolaşımında uzun süre kalmasını sağlamaktadır(185). Polisorbat 80 adsorbsiyon miktarının PLGA foksiyonel gruplarına (ester veya asit uç) bağlı olup olmadığını incelemek için polisorbat 80 miktar tayin yöntemi geliştirilmiştir. Her iki PLGA türü için elde edilen polisorbat 80 adsorbsiyon miktar değerleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Bkz. Tablo 4.11.). Ester uçlu PLGA bEnd.3 endotel hücrelerinde daha az sitotoksik olduğu için diğer tüm çalışmalarda ester uçlu PLGA NP kullanılmıştır.

### **Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometre (FTIR) Analizi**

Formülasyon optimizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra optimum dosetaksel ve kurkumin yüklü PLGA nanopartikül formülasyonunun FTIR analizleri yapılmıştır. Dosetaksel, kurkumumin ve PLGA polimeri arasında herhangi bir etkileşim olup olmadığını ve etkin maddeler yüklendikten sonra oluşan nanopartiküllerde değişim

incelenmiştir. Dosetaksel nanopartiküller, kızılötesi spektrumları şekil 4.10.'de gösterilmiştir. Dosetakselin ana piki (ester germe)  $1722\text{ cm}^{-1}$ 'de, C = C gerilmesinden dolayı kurkumin karakteristik piki  $1628\text{ cm}^{-1}$ 'de ve PLGA karboksilik asidin karakteristik titreşimi  $1760\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlenmiştir (186, 187). Dosetaksel ve kurkumin yüklü PLGA nanopartiküllere bakınca, kurkumin ve dosetaksle özgü pikler belirgin bir şekilde şiddetleri azalmıştır. Kurkumin ve dosetakselin nanopartiküllere tamama yakın enkapsüle olması dolayısıyla bu piklerin şiddetlerinin azaldığı düşünülmüştür. PLGA CH gerilmesinden dolayı karakteristik pik ( $2885\text{-}3010\text{ cm}^{-1}$ )  $2985\text{ cm}^{-1}$  gözlemlenmiş olup polisorbata 80 kaplamasından sonra gücü belirgin bir şekilde azalarak kaplamanın gerçekleştiğini doğrulamıştır. Dosetaksel, kurkumin, dosetaksel-kurkumin, PLGA, dosetaksel-kurkumin-PLGA fiziksel karışımı ve dosetaksel ve kurkumin yüklü nanopartikülleri ile yapılan FTIR çalışmalarında da kimyasal geçimsizliğin bir göstergesi olabilecek yeni fonksiyonel gruplara ilişkin pikler gözlenmemiştir (188). Tüm FTIR verileri ışığında öncelikli olarak dosetaksel ve kurkumin yüklü PLGA nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde hazırlandığı ve sonrasında polisorbata 80 kaplamanın başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini söylemek mümkündür.

### **Enkapsülasyon Etkinliği ve In Vitro Salım**

Kurkumin stabilitesi normal PBS pH 7.4 çözeltilerde dayanıksız olduğu için %10 FBS salım ortamına eklenerek stabilitesi artırılmıştır (104, 189). Kurkumin stabilite çalışmalarında 72.saaate kadar %10 FBS içeren PBS çözeltisinde yüksek stabilite göstermiştir. Hem dosetaksel hem de kurkumin hidrofobik yapılarından dolayı sudaki çözünürlükleri düşüktür. Sink koşulunu sağlamak için salım ortamına %0,1 polisorbata 80 eklenmiştir. Kurkumin-dosetaksel yüklü PLGA NP formülasyonlarından dosetaksel ve kurkumin salım profilleri Şekil 4.14.'te gösterilmiştir. Gösterildiği gibi, dosetaksel, ilk 2 saatlik inkübasyon sonrasında %29,3'lük bir ilk 'patlama' (burst release) salımı göstermiş ve 4 gün içinde yüklenen miktarın %41,84'ünü serbest bırakmıştır. 48 saat sonra ilave dosetaksel salınmamıştır. Bu dosetakselin ilk aniden salımı, PLGA NP'nin en dış katmanlarına ve nanopartikül

yüzeyine adsorbe edilen ilaç moleküllerinden kaynaklanmaktadır. İlacın difüzyonu, erozyon, polimer matrisinin şişmesi ve polimerin bozulması, ilaç salımı için ana mekanizmalar olarak kabul edilmektedir (190). Sürekli salım profili, polimerlerin yavaş bozunma hızına bağlanır ve bu nedenle dosetakselin NP'lerden dosetaksel salınması esas olarak ilaç difüzyonuna ve matris erozyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir (191, 192). Dosetakselin PLGA NP'lerinden bifazik salım davranışı başka çalışmalarda da gösterilmiştir (193-195). Kurkumin ise 4 gün içinde yüklenen miktarın %78,9'unu açığa çıkararak daha yavaş ve sürekli bir salım profili göstermiştir. İlk 18 saat boyunca yaklaşık %51,8, takip eden 96 saat boyunca ise %78,9 kurkumin salınmıştır. Daha sürekli bir salım olmasına rağmen yine de bifazik bir salım grafiği olarak değerlendirilmiştir (196).

İlaç salım mekanizması, in vitro çözünme verileri çeşitli kinetik modellere uydurularak bulundu ve salım eksponenti, kinetik sabit ve regresyon katsayısı değerleri belirlenmiştir. Sıfır derece, birinci derece, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas, optimum NP formülasyonundan ilaç salımını belirleyen başlıca modellerdir ve en uygun modeli seçme kriterleri, regresyon katsayısına dayalıdır.

Dosetaksel ilaç salım modeli Higuchi modeline uymaktadır ( $R^2=0.9017$ ). Higuchi tarafından geliştirilen matematiksel ilişkiler, bir difüzyon ortamına gönderilen homojen matrislerde dağılmış aktif maddeler ile ilgilidir. Higuchi, matristeki düşük konsantrasyonda aktif madde çözünürlük ve salım matrisin gözenekliliğinden (parçalamasından) kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kurkumin salım modeli olarak Korsmeyer Peppas modeline uymaktadır ( $R^2=0.9652$ ). Korsmeyer Peppas yasası modeli, salım mekanizması bilinmediğinde veya birden fazla ilaç salımı fenomeni türü söz konusu olduğunda polimerik sistemlerden ilaç salımının incelenmesi için yararlıdır (197).

## **5.4. Hücre Kültür Çalışmaları**

### **5.4.1. Dosetaksel ve Kurkumin İçermeyen PLGA Nanopartiküllerinin biyouyumluluklarının İncelenmesi**



Biyolojik olarak parçalanabilir bir polimer olan polilaktik-ko-glikolik asidin (PLGA) ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılması çok yoğun olarak araştırılmaktadır (198). PLGA, yüksek derecede biyoyumlu, FDA onaylı bir polimer ailesidir (199, 200). PLGA ile hazırlanan nanopartiküller; farklı PLA/PGA oranlarına ve uç gruplarına (ester veya asit) sahip olabilmekte ve partikül büyüklüğü, şekli, yüzey morfolojisi, zeta potansiyeli gibi partikül özellikleri değiştirilebilmektedir (201, 202).

Bu tez kapsamında, hazırlanan PLGA nanopartiküllerin biyoyumluluklarının incelenmesi için bEnd.3 fare endotel hücreleri kullanılmıştır. PLGA uç gruplarının ve polisorbata 80 kaplamanın sitotoksikite üzerindeki etkilerini görmek amacı ile biyoyumluluk çalışmaları yapılmıştır. Asit uçlu PLGA NP, ester uçlu PLGA NP, polisorbata 80 kaplı asit uçlu PLGA NP ve polisorbata 80 kaplı ester uçlu PLGA NP çeşitli konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat süre inkübasyon sonrasında bEnd.3 hücrelerindeki sitotoksikite MTT yöntemi ile incelenmiştir. %80 üzerinde canlılık gösteren konsantrasyonlar, güvenli olarak değerlendirilmiştir. Asit uçlu PLGA NPler ester uçlu PLGA NPlere göre daha yüksek sitotoksikite göstermiştir. Ayrıca, polisorbata 80 kaplı olan PLGA NPler, kaplaması olmayanlara göre daha sitotoksik olduğu gözlemlenmiştir. Polisorbata 80 kaplamasından sonra PLGA NPlerin hücre içine alımları artacağından, buna bağlı olarak toksisitenin artmış olabileceği düşünülmektedir. 72 saat inkübasyon sürenin sonunda bütün formülasyonların 0.312  $\mu\text{M}$  ve altındaki konsantrasyonlarda güvenli olduğu bulunmuştur. In vitro hücre kültür deneylerinde kullanılan ester uçlu PLGA NPler, polisorbata 80 kaplanmasından bağımsız olarak 1.25  $\mu\text{M}$  ve altındaki konsantrasyonlarda güvenli olarak değerlendirilmiştir. Takip eden hücre kültür çalışmalarında ilaçları enkapsüle etmek için gerekli PLGA miktarları için canlılığın %80'nin üzerinde olmasına dikkat edilmiştir. (Bkz. Şekil 4.16.). Bu sonuçlar beklenildiği üzere boş PLGA NP'lerin doz bağımlı olarak bir toksisite gösterdiğini fakat dosetaksel ve kurkumin taşınması için gerekli konsantrasyonlarda belirgin bir toksisiteye maruziyet vermediğini göstermiştir.

#### 5.4.2. Dosetaksel ve Kurkumin Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksitelerinin İncelenmesi

Nanopartiküllerin etkinlikleri karşılaştırılırken öncelikli olarak dosetaksel ve kurkumin çözeltilerinin U87 hücre hattında IC50 değerleri bulunmuştur. Dosetaksel sitostatik etkisinden dolayı 24 saat, 48 saat, 72 saat, 96 saat ve 120 saat olmak üzere beş farklı süre boyunca hücrelerle inkübe edilmiş, 24, 48 ve 72. saat sonunda hücrelerde canlılık %50 değerinin altına inmediğinden bu zaman noktalarında IC50 değerleri hesaplanamamıştır (Bkz. Şekil 4.19.). 120 saat sonunda dosetakselin U87 glioma hücrelerinde IC 50 değeri 5.2 nM bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.18.). Kurkumin çözeltisinin ise 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon süresi sonunda sadece 48 ve 72.saatten sonra canlılık değeri %50'nin altına düşmüştür. 48.saat ve 72.saat sonunda kurkumin çözeltisi IC50 değerleri sırası ile 71.11  $\mu\text{M}$  ve 40.08  $\mu\text{M}$  bulunmuştur.

Yukarıdaki bilgiler ışığında dosetaksel ve kurkuminin kombine halde, U87 hücre hattında sitotoksiteleri incelenmek amacı ile 72 saat, 96 saat ve 120 saat formülasyonlar inkübasyon edilmiştir. Dosetaksel konsantrasyonu 0.07  $\mu\text{M}$  sabit tutularak, 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  ve 75  $\mu\text{M}$  kurkumin konsantrasyonları (IC50 değerin altında ve üzerinde) hücrelere uygulanmıştır. Sitotoksite değerleri en düşükten en yükseğe doğru sırası ile 0.07  $\mu\text{M}$  DTX çözeltisi, 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  ve 75  $\mu\text{M}$  CCM çözeltileri, 0.07  $\mu\text{M}$  DTX + 25  $\mu\text{M}$  CCM çözeltisi, 0.07  $\mu\text{M}$  DTX + 50  $\mu\text{M}$  CCM çözeltisi ve 0.07  $\mu\text{M}$  DTX + 75  $\mu\text{M}$  CCM çözeltisi olarak bulunmuştur (şekil 4.20.). 0.07  $\mu\text{M}$  DTX + 50  $\mu\text{M}$  CCM çözeltisi ve 0.07  $\mu\text{M}$  DTX + 75  $\mu\text{M}$  CCM çözeltileri arasında anlamlı bir fark ( $p < 0.05$ ) bulunmadığı için 75  $\mu\text{M}$  CCM NPlere yüklenmemiştir. Elde edilen bu veriler ışığında kurkuminin belirtilen bu 2 konsantrasyonu (25  $\mu\text{M}$  ve 50  $\mu\text{M}$ ) ile 0.07  $\mu\text{M}$  dosetaksel içerecek şekilde PLGA NP formülasyonlar hazırlanarak hücrelere uygulanmıştır (Bkz. Şekil 4.21.). 72.saat sonunda dosetaksel çözeltisinin toksisite değeri %49,9 iken 25  $\mu\text{M}$  CCM ve 50  $\mu\text{M}$  CCM ile kombinasyonunda sırası ile %23,4 ve %6,4 oranına düşmüştür (yaklaşık olarak 25  $\mu\text{M}$  CCM için 2 kat ve 50  $\mu\text{M}$  CCM için 6 kat toksisite artış). Dosetaksel çözeltisi, dosetaksel yüklü PLGA NPe göre daha toksik bulunmuştur. Aynı şekilde 0.07  $\mu\text{M}$  DTX ve 25  $\mu\text{M}$  CCM kombine çözelti, 0.07  $\mu\text{M}$  DTX ve 25  $\mu\text{M}$  CCM yüklü PLGA NPlerden toksisitesi daha yüksektir. Tam tersi

olarak 0.07  $\mu\text{M}$  DTX ve 50  $\mu\text{M}$  CCM yüklü PLGA NP, 0.07  $\mu\text{M}$  DTX ve 50  $\mu\text{M}$  kombine çözeltiye göre toksisitesi daha yüksek bulunmuştur. Bu durumun dosetaksel yüklü PLGA NPlerden yavaş ve sürekli dosetaksel salımından kaynaklandığını düşünülmektedir. Polisorbat 80 kaplamanın U87 hücrelerinde toksisiteyi bir miktar arttırmış olmasına rağmen anlamlı bir fark yaratmamıştır ( $p > 0.05$ ).

Literatürde çeşitli çalışmalarda dosetaksel ve/veya türevi olan paklitaksel ve kurkumin kombine halde beyin kanser dahil olmak üzere, çeşitli kanser tedavisinde kullanılmak üzere incelenmiştir (203-205). Kurkumin, proliferasyonun inhibisyonu, apoptozu indükleme, invazyon ve metastazı inhibe etme ve anjiyogenezi azaltma özelliklerinde doaly glioblastoma gibi beyin kanser tümörlerinde antineoplastik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (206-208). Kurkumin sadece kanser hücrelerin oluşmasını önlemek ve normal hücreleri kemoterapiye bağlı hasarlardan korumasının yanında, kullanılan kemoterapötikleri duyarlı hale getirerek kemoterapinin klinik etkinliğini arttırmaktadır (209, 210). Bu çalışmalarda genel itibari ile kurkuminin, dosetaksel direnç mekanizmasının üstesinden gelinmesinde uygulanan kemoterapi dozunu azaltarak uygun bir aday olduğu göze çarpmaktadır. Yapılan tez çalışması kapsamında da daha önce literatürde karşılaşılmayan bir nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem tasarlanarak kurkumin ve dosetaksel taşınması sağlanmış ve literatür verileriyle örtüşür şekilde sinerjistik bir etki elde edilmiştir.

### 5.4.3. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımlarının İncelenmesi

Nanopartiküllerin hücre içine alımları belirlenirken tez çalışmalarında kullanılan bEnd.3 endotel hücre ve U87 glioma hücre hatları kullanılarak nanopartiküllerin hücre içine alımları floresan mikroskop ve akım sitometri çalışmalarıyla araştırılmıştır. Polisorbat 80 kaplamanın etkinliğinin araştırılması için öncelikli olarak iki hücre hattı kullanılarak akım sitometri cihazı ile polisorbat 80 kaplamalı nil kırmızısı yüklü PLGA NP ve kaplama olmayan nil kırmızısı yüklü PLGA NP gruplarının sayısal olarak hücre içine alım oranları karşılaştırılmıştır. Her iki hücre hattında da polisorbat 80 kaplaması olan PLGA NPler daha yüksek oranda hücre içine

girmiştir. 30.dk, 1.saat, 2.saat, 4.saat ve 8.saat ortalama floresan yoğunluk (MFI) değerleri incelendiğinde 4 saat inkübasyon sonunda en yüksek hücre için alım gözlemlenmiştir. 1 saat sonra her iki hücre hattında da polisorbata 80 kaplamalı PLGA NP, kaplama olmayan PLGA NP'lere göre hücre içine alımları daha yüksek bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.22.). Bu sonuçlarda polisorbata 80 kaplamanın hücre içine alımı arttırdığını göstermektedir. Tez çalışmasında kullanılan hücre hatları dışında da polisorbata 80 ile PLGA nanopartiküllerini hücre içine alımının artırılabilirliğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (211-215).

Formülasyonların PLGA NP'lerini hücrenin hangi bölgesini taşıdığını görmek ve akım sitometri çalışmalarını desteklemek amacıyla formülasyonların 4 saat inkübasyon sonrası floresan mikroskopla görüntüleri de alınmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda akım sitometri sonuçlarını destekleyen sonuçlar bulunmuş, ayrıca PLGA NP'ler ve nil kırmızı genel itibari ile sitoplazmada lokalize olduğu tespit edilmiştir. bEnd.3 hücrelerde polisorbata 80 kaplamalı ve kaplama olmayan PLGA NP'lerde boya salımı gözlenmemiş ama U87 hücrelerinde sitoplazmada salınan boya açık bir şekilde gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 4.23.). Hücre içine alım ile ilgili yapılan tüm bu çalışmalar sitotoksikite verilerini destekleyici şekilde olup polisorbata 80 kaplamanın nanopartikül sistemin etkinliğini arttırdığını kanıtlayıcı niteliktedir.

### **5.5. In Vivo Çalışmalar**

Hücre kültüründe elde edilen sonuçlarda polisorbata 80 kaplamanın hücre içine alımı belirgin şekilde arttırdığı tespit edildikten sonra in vivo ortamda polisorbata kaplamanın etkinliği değerlendirilmiştir. Polisorbata kaplı ve kaplı olmayan nanopartiküller farelere uygulandıktan 2 saat sonrasında fareler sakrifiye edilerek nanopartiküllerin biyodağılımları incelenmiştir. 2 saat sonunda alınan görüntülerde polisorbata kaplı nanopartiküllerin belirgin bir şekilde beyin dokusunda daha fazla akümüle olduğu saptanmıştır. Diğer dokulardaki dağılımlara bakıldığında ise karaciğerde benzer oranda akümülyasyon görünürken, kaplaması olmayan grupta ise akciğerde akümülyasyon olduğu saptanmıştır. Bu durum polisorbata 80 kaplı PLGA NP'lerin RES organları tarafından daha iyi korunduğu ve kanda kalış süresini arttırmış olabileceği

gösterilmiştir. Bu durum polisorbat 80 kaplamanın yan etkilerin azaltılmasında önemli bir faktör olabileceği de düşünülmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında yapılan çalışmalar şu şekilde özetlenebilir;

- Dosetaksel ve kurkumin yüklü PLGA nanopartikül öncelikle literatür araştırması ve önçalışmalar sonucunda kritik parametreleri olan partikül büyüklüğü, polidispersite (PDI) ve enkapsülasyon etkinliği üzerinde formülasyon parametreleri olarak organik/su faz oranı, ilaç miktarı ve PLGA miktarı değerlendirilmiştir.
- PLGA nanopartiküller tekli emülsiyon hazırlama yöntemi ile hazırlanarak, beyine taşınan ilaç miktarını kan beyin bariyerini aşarak arttırmak amacı ile polisorbata 80 kaplama yapılmıştır.
- En düşük partikül büyüklüğü, en yüksek enkapsülasyon etkinliği ve en düşük polidispersite değerlerini elde etmek için Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi kullanılarak en optimum formülasyon belirlenmiştir.
- Elde edilen optimum partikül büyüklüğü 151.2 nm, enkapsülasyon etkinliği %98 ve polidispersite değeri 0.057 olarak belirlenmiştir.
- En uygun formülasyon belirlendikten sonra polisorbata 80 kaplama yapılarak ve polisorbata 80 miktar tayin yöntemi geliştirilerek miktar tayin analizi yapılmıştır.
- Elde edilen PLGA ve polisorbata 80 kaplı PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu için DLS, Zeta Potansiyeli, TEM, SEM, FTIR, in vitro İlaç Salımı analizleri yapılarak ve tüm karakterizasyon çalışmaları sonucunda literatür ile örtüşür sonuçlar bulunmuştur.
- Karakterizasyon çalışmaları yapılan PLGA ve polisorbata 80 kaplı PLGA nanopartiküllerin biyouyumluluklarının incelenmesi için bEnd.3 fare endotel hattında sitotoksikite analizleri yapılarak ve toksik olmayan dozların konsantrasyonları tespit edilmiştir.
- Ester uçlu PLGA nanopartiküller asit uçlu PLGA nanopartiküllere göre bEnd.3 hücrelerde daha toksik olduğu tespit edilmiştir. Polisorbata 80 kaplaması, PLGA nanopartiküllerin bEnd.3 hücrelerinde toksisiteyi arttırmıştır.

- Kurkumin ile kombine dosetaksel, tek başına dosetaksel göre U87 glioma hücrelerinde belirgin bir şekilde daha etkin olduğu belirlenmiştir.
- Kurkumin ve dosetaksel yüklü PLGA nanopartiküller dosetaksel ve kurkumin çözeltilere göre daha yüksek etkinliğe sahiptir.
- PLGA ve polisorbitat 80 kaplamalı PLGA nanopartikülleri bEnd.3 ve U87 olmak üzere iki farklı hücre hattında hücre içine alım çalışmaları yapılarak, polisorbitat 80 kaplama olan PLGA NPler daha yüksek oranda hücreye girdiği tespit edilmiştir.
- Flamma 774 hidrofobik boya ile CD1 farelerde polisorbitat 80 kaplamalı PLGA nanopartiküller, polisorbitat 80 kaplaması olmayan PLGA nanopartiküllere göre daha yüksek oranda beyine girdiği tespit edilmiştir.
- Kan beyin bariyerini aşarak beyine giren polisorbitat 80 kaplamalı PLGA nanopartiküller enjeksiyondan 2 saat sonra en yüksek miktarda tespit edilmiştir.
- CD1 farelerde polisorbitat 80 kaplı PLGA NP diğer organlarda kaplamasız PLGA NPlere göre daha az akümülayon göstermiştir.

Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde polisorbitat 80 kaplamalı veya kaplamasız PLGA nanopartiküllerinin dosetaksel ve kurkumin içeren nanopartikül şeklinde tasarlanan ilaç taşıyıcı sistemin beyin kanseri olan glioma tedavisi için umut vadeci bir tedavi şekli olabileceği sonucuna varılmıştır.

Gelecek çalışmalarda, polisorbitat 80 kaplamalı ve kaplamasız PLGA nanopartiküllerin, kandaki davranışlarını anlamak için genişletilmiş biyodağılım çalışmaları ve farmakokinetik çalışmaları sıçanlarda planlanabilmektedir.

## 7. Kaynaklar

1. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Artico M. Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. *Anatomical record Part B, New anatomist*. 2006;289(1):3-8.
2. el-Bacha RS, Minn A. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 1999;45(1):15-23.
3. Pardridge WM. Molecular Trojan horses for blood–brain barrier drug delivery. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006;6(5):494-500.
4. Wait SD, Prabhu RS, Burri SH, Atkins TG, Asher AL. Polymeric drug delivery for the treatment of glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 2015;17(Suppl 2):ii9-ii23.
5. Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical neurology international*. 2014;5:64.
6. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2005;352(10):987-96.
7. Schwöpe AD, Wise DL, Howes JF. Lactic/glycolic acid polymers as narcotic antagonist delivery systems. *Life Sciences*. 1975;17(12):1877-85.
8. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*. 1996;17(2):93-102.
9. Zou L, Song X, Yi T, Li S, Deng H, Chen X, et al. Administration of PLGA nanoparticles carrying shRNA against focal adhesion kinase and CD44 results in enhanced antitumor effects against ovarian cancer. *Cancer gene therapy*. 2013;20(4):242-50.
10. Luan X, Bodmeier R. Influence of the poly(lactide-co-glycolide) type on the leuprolide release from in situ forming microparticle systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2006;110(2):266-72.
11. Takada S, Yamagata Y, Misaki M, Taira K, Kurokawa T. Sustained release of human growth hormone from microcapsules prepared by a solvent evaporation technique. *Journal of Controlled Release*. 2003;88(2):229-42.
12. Vij N, Min T, Marasigan R, Belcher CN, Mazur S, Ding H, et al. Development of PEGylated PLGA nanoparticle for controlled and sustained drug delivery in cystic fibrosis. *Journal of nanobiotechnology*. 2010;8:22.
13. Koffie RM, Farrar CT, Saidi LJ, William CM, Hyman BT, Spires-Jones TL. Nanoparticles enhance brain delivery of blood–brain barrier-impermeable probes for in vivo optical and magnetic resonance imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(46):18837-42.
14. Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*. 2016;235:34-47.
15. Ana Rute N, Joana Fontes Q, Babette W, Ignacio AR, Pierre-Olivier C, Salette R. Solid lipid nanoparticles as a vehicle for brain-targeted drug delivery: two new strategies of functionalization with apolipoprotein E. *Nanotechnology*. 2015;26(49):495103.
16. Jain D, Bajaj A, Athawale R, Shrikhande S, Goel PN, Nikam Y, et al. Surface-coated PLA nanoparticles loaded with temozolomide for improved brain deposition and potential treatment of gliomas: development, characterization and in vivo studies. *Drug Delivery*. 2016;23(3):989-1006.



17. Gelperina S, Maksimenko O, Khalansky A, Vanchugova L, Shipulo E, Abbasova K, et al. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of the formulation parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;74(2):157-63.
18. Koffie RM, Farrar CT, Saidi L-J, William CM, Hyman BT, Spires-Jones TL. Nanoparticles enhance brain delivery of blood–brain barrier-impermeable probes for in vivo optical and magnetic resonance imaging. 2011;108(46):18837-42.
19. Petri B, Bootz A, Khalansky A, Hekmatara T, Müller R, Uhl R, et al. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Revisiting the role of surfactants. *Journal of Controlled Release*. 2007;117(1):51-8.
20. Luck M, Pistel KF, Li YX, Blunk T, Muller RH, Kissel T. Plasma protein adsorption on biodegradable microspheres consisting of poly(D,L-lactide-co-glycolide), poly(L-lactide) or ABA triblock copolymers containing poly(oxyethylene). Influence of production method and polymer composition. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 1998;55(2-3):107-20.
21. Kreuter J. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2004;4(5):484-8.
22. Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V, Ramge P, Cychutek K, Koch-Brandt C, et al. Apolipoprotein-mediated Transport of Nanoparticle-bound Drugs Across the Blood-Brain Barrier. *Journal of Drug Targeting*. 2002;10(4):317-25.
23. Shamenkov D, Petrov V, Ramge P, Cychutek K, Koch-Brandt C, Alyautdin R. Apolipoprotein-mediated Transport of Nanoparticle-bound Drugs Across the Blood-Brain Barrier AU - Kreuter, Jörg. *Journal of Drug Targeting*. 2002;10(4):317-25.
24. Wagner S, Zensi A, Wien SL, Tschickardt SE, Maier W, Vogel T, et al. Uptake Mechanism of ApoE-Modified Nanoparticles on Brain Capillary Endothelial Cells as a Blood-Brain Barrier Model. *PLOS ONE*. 2012;7(3):e32568.
25. Baker SD, Sparreboom A, Verweij J. Clinical Pharmacokinetics of Docetaxel. *Clinical Pharmacokinetics*. 2006;45(3):235-52.
26. Van Asperen J, Van Tellingem O, Beijnen JH. The pharmacological role of P-glycoprotein in the intestinal epithelium. *Pharmacological research*. 1998;37(6):429-35.
27. Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK, et al. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(5):2031-5.
28. Panda AK, Chakraborty D, Sarkar I, Khan T, Sa G. New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin. *Journal of Experimental Pharmacology*. 2017;9:31-45.
29. Allegra A, Innao V, Russo S, Gerace D, Alonci A, Musolino C. Anticancer Activity of Curcumin and Its Analogues: Preclinical and Clinical Studies. *Cancer Investigation*. 2017;35(1):1-22.
30. Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*. 2011;10:12.
31. CHENG W-L, HUANG C-Y, TAI C-J, CHANG Y-J, HUNG C-S. Maspin Enhances the Anticancer Activity of Curcumin in Hormone-refractory Prostate Cancer Cells. *Anticancer Research*. 2018;38(2):863-70.
32. Yu T, Chen C, Sun Y, Sun H, Li T-h, Meng J, et al. ABT-737 sensitizes curcumin-induced anti-melanoma cell activity through facilitating mPTP death pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;464(1):286-91.

33. Bai Q-X, Zhang X-Y. Curcumin Enhances Cytotoxic Effects of Bortezomib in Human Multiple Myeloma H929 Cells: Potential Roles of NF- $\kappa$ B/JNK. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(4):4831.
34. Dahmke IN, Boettcher SP, Groh M, Mahlke U. Cooking enhances curcumin anti-cancerogenic activity through pyrolytic formation of "deketene curcumin". *Food chemistry*. 2014;151:514-9.
35. Huang TY, Tsai TH, Hsu CW, Hsu YC. Curcuminoids suppress the growth and induce apoptosis through caspase-3-dependent pathways in glioblastoma multiforme (GBM) 8401 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(19):10639-45.
36. Banerjee S. Combinatorial effect of curcumin with docetaxel modulates apoptotic and cell survival molecules in prostate cancer. 2017;9:235-45.
37. Hong JM, Park CS, Nam-Goong IS, Kim YS, Lee JC, Han MW, et al. Curcumin Enhances Docetaxel-Induced Apoptosis of 8505C Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells. *Endocrinology and Metabolism*. 2014;29(1):54-61.
38. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological reviews*. 2005;57(2):173-85.
39. Wong A, Ye M, Levy A, Rothstein J, Bergles D, Searson P. The blood-brain barrier: an engineering perspective. 2013;6(7).
40. Enerson BE, Drewes LR. The Rat Blood—Brain Barrier Transcriptome. 2006;26(7):959-73.
41. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte—endothelial interactions at the blood—brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006;7(1):41-53.
42. Gumbleton M, Audus KL. Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *J Pharm Sci*. 2001;90(11):1681-98.
43. Georgieva JV, Hoekstra D, Zuhorn IS. Smuggling Drugs into the Brain: An Overview of Ligands Targeting Transcytosis for Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutics*. 2014;6(4):557-83.
44. Mudshinge SR, Deore AB, Patil S, Bhalgat CM. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2011;19(3):129-41.
45. Hajieva P. The Effect of Polyphenols on Protein Degradation Pathways: Implications for Neuroprotection. *Molecules*. 2017;22(1):159.
46. Singh R, Lillard JW, Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*. 2009;86(3):215-23.
47. Zhou Y, Peng Z, Seven ES, Leblanc RM. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2018;270:290-303.
48. Zaman M, Ahmad E, Qadeer A, Rabbani G, Khan RH. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation. *International Journal of Nanomedicine*. 2014;9:899-912.
49. Tamba BI, Streinu V, Foltea G, Neagu AN, Dodi G, Zlei M, et al. Tailored surface silica nanoparticles for blood-brain barrier penetration: Preparation and in vivo investigation. *Arabian Journal of Chemistry*. 2018.
50. Song Y, Du D, Li L, Xu J, Dutta P, Lin Y. In Vitro Study of Receptor-Mediated Silica Nanoparticles Delivery across Blood-Brain Barrier. *ACS applied materials & interfaces*. 2017;9(24):20410-6.
51. Poste G, Kirsh R. Site-Specific (Targeted) Drug Delivery in Cancer Therapy. *Bio/Technology*. 1983;1:869.
52. Sah E, Sah H. Recent Trends in Preparation of Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles by Mixing Polymeric Organic Solution with Antisolvent. *Journal of Nanomaterials*. 2015;2015:22.

53. Sadat Tabatabaei Mirakabad F, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Yamchi MR, Milani M, Zarghami N, et al. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(2):517-35.
54. Cai Q, Wang L, Deng G, Liu J, Chen Q, Chen Z. Systemic delivery to central nervous system by engineered PLGA nanoparticles. *American journal of translational research*. 2016;8(2):749-64.
55. Frohlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:5577-91.
56. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. 1989;86(2):695-8.
57. Woodcock D, Linsenmeyer M, Chojnowski G, Kriegler A, Nink V, Webster L, et al. Reversal of multidrug resistance by surfactants. 1992;66(1):62-8.
58. Nerurkar MM, Burton PS, Borchardt RTJPr. The use of surfactants to enhance the permeability of peptides through Caco-2 cells by inhibition of an apically polarized efflux system. 1996;13(4):528-34.
59. Kreuter J, Ramge P, Petrov V, Hamm S, Gelperina SE, Engelhardt B, et al. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. 2003;20(3):409-16.
60. Sempf K, Arrey T, Gelperina S, Schorge T, Meyer B, Karas M, et al. Adsorption of plasma proteins on uncoated PLGA nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013;85(1):53-60.
61. Alyautdin RN, Petrov VE, Langer K, Berthold A, Kharkevich DA, Kreuter J. Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm Res*. 1997;14(3):325-8.
62. Petri B, Bootz A, Khalansky A, Hekmatara T, Muller R, Uhl R, et al. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2007;117(1):51-8.
63. Kreuter J, Alyautdin RN, Kharkevich DA, Ivanov AA. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain research*. 1995;674(1):171-4.
64. Alyautdin R, Gothier D, Petrov V, Kharkevich D, Kreuter J. Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. 1995;41(1):44-8.
65. Blasi P, Giovagnoli S, Schoubben A, Ricci M, Rossi C. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59(6):454-77.
66. Quintanar-Guerrero D, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug development and industrial pharmacy*. 1998;24(12):1113-28.
67. Leucuta SE. Micro and Nanoparticles as Drug Carriers. In: Sohns T, Voicu VA, Szinicz L, Finke E-J, Mircioiu C, Lundy P, et al., editors. *NBC Risks Current Capabilities and Future Perspectives for Protection*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1999. p. 411-39.
68. Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, K. Banerjee R. *Turmeric and Curcumin: Biological actions and medicinal applications* 2003.
69. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. 2009;14(2):141-53.

70. Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular cancer*. 2011;10:12-.
71. Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta medica*. 1991;57(1):1-7.
72. Wang X, Deng J, Yuan J, Tang X, Wang Y, Chen H, et al. Curcumin exerts its tumor suppressive function via inhibition of NEDD4 oncoprotein in glioma cancer cells. *International journal of oncology*. 2017;51(2):467-77.
73. Klinger NV, Mittal S. Therapeutic Potential of Curcumin for the Treatment of Brain Tumors. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:14.
74. LoTempio MM, Veena MS, Steele HL, Ramamurthy B, Ramalingam TS, Cohen AN, et al. Curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(19 Pt 1):6994-7002.
75. Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal BB. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. *International journal of cancer*. 2004;111(5):679-92.
76. Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P, Aggarwal BB. Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene*. 2001;20(52):7597-609.
77. Lin YG, Kunnumakkara AB, Nair A, Merritt WM, Han LY, Armaiz-Pena GN, et al. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-kappaB pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(11):3423-30.
78. Mohandas KM, Desai DC. Epidemiology of digestive tract cancers in India. V. Large and small bowel. *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology*. 1999;18(3):118-21.
79. Schaaf C, Shan B, Buchfelder M, Losa M, Kreutzer J, Rachinger W, et al. Curcumin acts as anti-tumorigenic and hormone-suppressive agent in murine and human pituitary tumour cells in vitro and in vivo. *Endocrine-related cancer*. 2009;16(4):1339-50.
80. Miller M, Chen S, Woodliff J, Kansra S. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits cell proliferation, induces apoptosis, and decreases hormone levels and secretion in pituitary tumor cells. *Endocrinology*. 2008;149(8):4158-67.
81. Choi BH, Kim CG, Bae Y-S, Lim Y, Lee YH, Shin SY. p21Waf1/Cip1 expression by curcumin in U-87MG human glioma cells: role of early growth response-1 expression. *Cancer research*. 2008;68(5):1369-77.
82. Bangaru MLY, Chen S, Woodliff J, Kansra S. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis and blocks migration of human medulloblastoma cells. *Anticancer research*. 2010;30(2):499-504.
83. Zannotto-Filho A, Braganhol E, Klafke K, Figueiró F, Terra SR, Paludo FJ, et al. Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastomas. *Cancer letters*. 2015;358(2):220-31.
84. Zhuang W, Long L, Zheng B, Ji W, Yang N, Zhang Q, et al. Curcumin promotes differentiation of glioma-initiating cells by inducing autophagy. *Cancer science*. 2012;103(4):684-90.
85. Aoki H, Takada Y, Kondo S, Sawaya R, Aggarwal BB, Kondo Y. Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular pharmacology*. 2007;72(1):29-39.

86. Langone P, Debata PR, Inigo JDR, Dolai S, Mukherjee S, Halat P, et al. Coupling to a glioblastoma-directed antibody potentiates antitumor activity of curcumin. *International journal of cancer*. 2014;135(3):710-9.
87. Purkayastha S, Berliner A, Fernando SS, Ranasinghe B, Ray I, Tariq H, et al. Curcumin blocks brain tumor formation. *Brain research*. 2009;1266:130-8.
88. Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, Van Leeuwen R, Huang M-T, Fisher C, et al. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Molecular Medicine*. 1998;4(6):376-83.
89. Bisht S, Feldmann G, Soni S, Ravi R, Karikar C, Maitra A, et al. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *Journal of nanobiotechnology*. 2007;5(1):3.
90. Woo M-S, Jung S-H, Kim S-Y, Hyun J-W, Ko K-H, Kim W-K, et al. Curcumin suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting the PKC to MAPK signaling pathways in human astrogloma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;335(4):1017-25.
91. Kim S-Y, Jung S-H, Kim H-S. Curcumin is a potent broad spectrum inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression in human astrogloma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;337(2):510-6.
92. Bhandarkar SS, Arbiser JL. Curcumin as an inhibitor of angiogenesis. *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*: Springer; 2007. p. 185-95.
93. Thaloor D, Singh AK, Sidhu GS, Prasad PV, Kleinman HK, Maheshwari RK. Inhibition of angiogenic differentiation of human umbilical vein endothelial cells by curcumin. *Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research*. 1998;9(4):305-12.
94. Bachmeier B, Nerlich A, Iancu C, Cilli M, Schleicher E, Vené R, et al. The chemopreventive polyphenol Curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice. *Cellular physiology and biochemistry*. 2007;19(1-4):137-52.
95. Qian Y, Ma J, Guo X, Sun J, Yu Y, Cao B, et al. Curcumin Enhances the Radiosensitivity of U87 Cells by Inducing DUSP-2 Up-Regulation (Retraction of vol 35, pg 1381, 2015). KARGER ALLSCHWILERSTRASSE 10, CH-4009 BASEL, SWITZERLAND; 2016.
96. Pauwels B, Wouters A, Peeters M, Vermorken JB, Lardon F. Role of cell cycle perturbations in the combination therapy of chemotherapeutic agents and radiation. *Future oncology*. 2010;6(9):1485-96.
97. Aravindan N, Madhusoodhanan R, Ahmad S, Johnson D, Herman TS. Curcumin inhibits NFkB mediated radioprotection and modulate apoptosis related genes in human neuroblastoma cells. *Cancer biology & therapy*. 2008;7(4):569-76.
98. Sharma S, Tanwar A, Gupta DK. Curcumin: an adjuvant therapeutic remedy for liver cancer. *commitment*. 2016;22:23.
99. Khaw AK, Hande MP, Kalthur G, Hande MP. Curcumin inhibits telomerase and induces telomere shortening and apoptosis in brain tumour cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2013;114(6):1257-70.
100. Thani A, Azela N, Sallis B, Nuttall R, Schubert FR, Ahsan M, et al. Induction of apoptosis and reduction of MMP gene expression in the U373 cell line by polyphenolics in *Aronia melanocarpa* and by curcumin. *Oncology reports*. 2012;28(4):1435-42.
101. Zanutto-Filho A, Braganhol E, Edelweiss MI, Behr GA, Zanin R, Schröder R, et al. The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2012;23(6):591-601.
102. Hossain MM, Banik NL, Ray SK. Synergistic anti-cancer mechanisms of curcumin and paclitaxel for growth inhibition of human brain tumor stem cells and LN18 and U138MG cells. *Neurochemistry international*. 2012;61(7):1102-13.
103. Wahlstrom B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta pharmacologica et toxicologica*. 1978;43(2):86-92.

104. Wang Y-J, Pan M-H, Cheng A-L, Lin L-I, Ho Y-S, Hsieh C-Y, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1997;15(12):1867-76.
105. Hoehle SI, Pfeiffer E, Metzler M. Glucuronidation of curcuminoids by human microsomal and recombinant UDP-glucuronosyltransferases. *Molecular nutrition & food research*. 2007;51(8):932-8.
106. Hoehle SI, Pfeiffer E, Sólyom AM, Metzler M. Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(3):756-64.
107. Ireson CR, Jones DJ, Orr S, Coughtrie MW, Boocock DJ, Williams ML, et al. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2002;11(1):105-11.
108. Yang KY, Lin LC, Tseng TY, Wang SC, Tsai TH. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2007;853(1-2):183-9.
109. Wahlström B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta pharmacologica et toxicologica*. 1978;43(2):86-92.
110. Schiborr C, Kocher A, Behnam D, Jandasek J, Toelstede S, Frank J. The oral bioavailability of curcumin from micronized powder and liquid micelles is significantly increased in healthy humans and differs between sexes. *Molecular nutrition & food research*. 2014;58(3):516-27.
111. Vadhan-Raj S, Weber DM, Wang M, Giralto SA, Thomas SK, Alexanian R, et al. Curcumin Downregulates NF- $\kappa$ B and Related Genes in Patients with Multiple Myeloma: Results of a Phase I/II Study. *Blood*. 2007;110(11):1177-.
112. Jones S. Head-to-head: docetaxel challenges paclitaxel. *European Journal of Cancer Supplements*. 2006;4(4):4-8.
113. Thirumaran R, Prendergast GC, Gilman PB. Chapter 7 - Cytotoxic Chemotherapy in Clinical Treatment of Cancer. In: Prendergast GC, Jaffee EM, editors. *Cancer Immunotherapy*. Burlington: Academic Press; 2007. p. 101-16.
114. Banks WA. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC neurology*. 2009;9 Suppl 1(Suppl 1):S3-S.
115. Tan Q, Liu X, Fu X, Li Q, Dou J, Zhai G. Current development in nanoformulations of docetaxel. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012;9(8):975-90.
116. Liu Z, Liu D, Wang L, Zhang J, Zhang N. Docetaxel-loaded pluronic p123 polymeric micelles: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Mol Sci*. 2011;12(3):1684-96.
117. Snyder JP, Nettles JH, Cornett B, Downing KH, Nogales E. The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(9):5312-6.
118. Yvon AM, Wadsworth P, Jordan MA. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Molecular biology of the cell*. 1999;10(4):947-59.
119. Van Poppel H. Recent docetaxel studies establish a new standard of care in hormone refractory prostate cancer. *The Canadian journal of urology*. 2005;12 Suppl 1:81-5.
120. Jiang S, Gong X, Zhao X, Zu Y. Preparation, characterization, and antitumor activities of folate-decorated docetaxel-loaded human serum albumin nanoparticles. *Drug Delivery*. 2015;22(2):206-13.
121. Kuppens IE, Bosch TM, van Maanen MJ, Rosing H, Fitzpatrick A, Beijnen JH, et al. Oral bioavailability of docetaxel in combination with OC144-093 (ONT-093). *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2005;55(1):72-8.
122. Shou M, Martinet M, Korzekwa KR, Krausz KW, Gonzalez FJ, Gelboin HV. Role of human cytochrome P450 3A4 and 3A5 in the metabolism of taxotere and its derivatives:

enzyme specificity, interindividual distribution and metabolic contribution in human liver. *Pharmacogenetics*. 1998;8(5):391-401.

123. Malingre MM, Beijnen JH, Schellens JH. Oral delivery of taxanes. *Investigational new drugs*. 2001;19(2):155-62.

124. ten Tije AJ, Verweij J, Loos WJ, Sparreboom A. Pharmacological effects of formulation vehicles : implications for cancer chemotherapy. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(7):665-85.

125. Yousefi A, Esmaeili F, Rahimian S, Atyabi F, Dinarvand R. Preparation and in vitro evaluation of a pegylated nano-liposomal formulation containing docetaxel. *Scientia Pharmaceutica*. 2009;77(2):453-64.

126. Pereira S, Egbu R, Jannati G, Al-Jamal WT. Docetaxel-loaded liposomes: The effect of lipid composition and purification on drug encapsulation and in vitro toxicity. *Int J Pharm*. 2016;514(1):150-9.

127. Zhang F, Chang M, Yu Y, Zhang Y, Liu G, Wei T, et al. Preparation and evaluation of lipid emulsified docetaxel-loaded nanoparticles. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2015;67(11):1546-55.

128. Valicherla GR, Dave KM, Syed AA, Riyazuddin M, Gupta AP, Singh A, et al. Formulation optimization of Docetaxel loaded self-emulsifying drug delivery system to enhance bioavailability and anti-tumor activity. *Scientific Reports*. 2016;6:26895.

129. Rafiei P, Haddadi A. Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:935-47.

130. Bowerman CJ, Byrne JD, Chu KS, Schorzman AN, Keeler AW, Sherwood CA, et al. Docetaxel-Loaded PLGA Nanoparticles Improve Efficacy in Taxane-Resistant Triple-Negative Breast Cancer. *Nano letters*. 2017;17(1):242-8.

131. Helgason HH, Koolen SL, Werkhoven E, Malingre MM, Kruijtzter CM, Huitema AD, et al. Phase II and pharmacological study of oral docetaxel plus cyclosporin A in anthracycline pre-treated metastatic breast cancer. *Current clinical pharmacology*. 2014;9(2):139-47.

132. Engels FK, Sparreboom A, Mathot RAA, Verweij J. Potential for improvement of docetaxel-based chemotherapy: a pharmacological review. *British Journal Of Cancer*. 2005;93:173.

133. Agency EM. Taxotere : summary of product characteristics. European Medicines Agency. 2012.

134. Sanofi-Aventis. Taxotere (docetaxel) injection concentrate: US prescribing information. 2012.

135. Owens Iii DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006;307(1):93-102.

136. Jones A, Harris AL. New developments in angiogenesis: A major mechanism for tumor growth and target for therapy. *Cancer Journal from Scientific American*. 1998;4(4):209-17.

137. Davis ME, Chen Z, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008;7(9):771-82.

138. Venturoli D, Rippe B. Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: Effects of molecular size, shape, charge, and deformability. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2005;288(4 57-4):F605-F13.

139. Jang SH, Wientjes MG, Lu D, Au JLS. Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharmaceutical Research*. 2003;20(9):1337-50.

140. Hori K, Suzuki M, Tanda S, Saito S. Characterization of Heterogeneous Distribution of Tumor Blood Flow in the Rat. *Japanese Journal of Cancer Research*. 1991;82(1):109-17.

141. Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2008;26(1):57-64.

142. Jain RK. Transport of Molecules in the Tumor Interstitium: A Review. *Cancer Research*. 1987;47(12):3039-51.
143. Jain RK. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Journal of Controlled Release*. 1998;53(1-3):49-67.
144. Mona B. Nanotechnology as a Promising Strategy for Anticancer Drug Delivery. *Current drug delivery*. 2018;15(4):497-509.
145. Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003;2(5):347-60.
146. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*. 2008;5(4):505-15.
147. Liechty WB, Peppas NA. Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012;80(2):241-6.
148. Chang JS, Huang YB, Hou SS, Wang RJ, Wu PC, Tsai YH. Formulation optimization of meloxicam sodium gel using response surface methodology. *Int J Pharm*. 2007;338(1-2):48-54.
149. Gohel MC, Amin AF. Formulation optimization of controlled release diclofenac sodium microspheres using factorial design. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 1998;51(2-3):115-22.
150. Nazzal S, Khan MA. Response surface methodology for the optimization of ubiquinone self-nanoemulsified drug delivery system. *AAPS PharmSciTech*. 2002;3(1):E3.
151. Shaikh MV, Kala M, Nivsarkar M. Formulation and optimization of doxorubicin loaded polymeric nanoparticles using Box-Behnken design: ex-vivo stability and in-vitro activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;100:262-72.
152. Baig MS, Ahad A, Aslam M, Imam SS, Aqil M, Ali A. Application of Box–Behnken design for preparation of levofloxacin-loaded stearic acid solid lipid nanoparticles for ocular delivery: Optimization, in vitro release, ocular tolerance, and antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;85:258-70.
153. Gupta M, Marwaha R, Dureja H. Formulation and Characterization of Gefitinib-loaded Polymeric Nanoparticles Using Box-Behnken Design. *Current Nanomedicine (Formerly: Recent Patents on Nanomedicine)*. 2019;9(1):46-60.
154. Yerlikaya F, Ozgen A, Vural I, Guven O, Karaagaoglu E, Khan MA, et al. Development and evaluation of paclitaxel nanoparticles using a quality-by-design approach. *J Pharm Sci*. 2013;102(10):3748-61.
155. Atkinson A, Donev A, Tobias R. *Optimum experimental designs, with SAS*: Oxford University Press; 2007.
156. Woitiski CB, Veiga F, Ribeiro A, Neufeld R. Design for optimization of nanoparticles integrating biomaterials for orally dosed insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009;73(1):25-33.
157. Dong CH, Xie XQ, Wang XL, Zhan Y, Yao YJ. Application of Box-Behnken design in optimisation for polysaccharides extraction from cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Food and Bioproducts Processing*. 2009;87(2):139-44.
158. Dreher MR, Liu W, Michelich CR, Dewhirst MW, Yuan F, Chilkoti A. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(5):335-44.
159. Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of Cell Science*. 1995;108(6):2369-79.
160. Storm G, Belliot SO, Daemen T, Lasic DD. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1995;17(1):31-48.



161. Troster SD, Kreuter J. Influence of the surface properties of low contact angle surfactants on the body distribution of <sup>14</sup>C-poly(methyl methacrylate) nanoparticles. *Journal of microencapsulation*. 1992;9(1):19-28.
162. Hekmatara T, Bernreuther C, Khalansky AS, Theisen A, Weissenberger J, Matschke J, et al. Efficient systemic therapy of rat glioblastoma by nanoparticle-bound doxorubicin is due to antiangiogenic effects. *Clinical neuropathology*. 2009;28(3):153-64.
163. Q2(R1) I. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
164. McCall RL, Sirianni RW. PLGA nanoparticles formed by single- or double-emulsion with vitamin E-TPGS. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2013(82):51015.
165. Xu X, Khan MA, Burgess DJ. A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API: I. Formulation, processing design and risk assessment. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;419(1):52-9.
166. Yerlikaya F, Ozgen A, Vural I, Guven O, Karaagaoglu E, Khan MA, et al. Development and Evaluation of Paclitaxel Nanoparticles Using a Quality-by-Design Approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;102(10):3748-61.
167. Madani F, Esnaashari SS, Mujokoro B, Dorkoosh F, Khosravani M, Adabi MJApb. Investigation of effective parameters on size of paclitaxel loaded PLGA nanoparticles. 2018;8(1):77.
168. Español L, Larrea A, Andreu V, Mendoza G, Arruebo M, Sebastian V, et al. Dual encapsulation of hydrophobic and hydrophilic drugs in PLGA nanoparticles by a single-step method: drug delivery and cytotoxicity assays. 2016;6(112):111060-9.
169. Tripathi A, Gupta R, Saraf SAJJPTR. PLGA nanoparticles of anti tubercular drug: drug loading and release studies of a water in-soluble drug. 2010;2(3):2116-23.
170. Dangi R, Shakya SJJOP, Sciences L. Preparation, optimization and characterization of PLGA nanoparticle. 2013;4(7).
171. Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Cytotoxicity and cytoprotective activities of natural compounds. The case of curcumin. *Xenobiotica*. 1996;26(7):667-80.
172. Omid Y, Campbell L, Barar J, Connell D, Akhtar S, Gumbleton MJBr. Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b. End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. 2003;990(1-2):95-112.
173. Yang S, Mei S, Jin H, Zhu B, Tian Y, Huo J, et al. Identification of two immortalized cell lines, ECV304 and bEnd3, for in vitro permeability studies of blood-brain barrier. *PLoS One*. 2017;12(10):e0187017.
174. Li Y, Wu M, Zhang N, Tang C, Jiang P, Liu X, et al. Mechanisms of enhanced antiglioma efficacy of polysorbate 80-modified paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles by focused ultrasound. *J Cell Mol Med*. 2018;22(9):4171-82.
175. Zhang Z, Feng S-S. In Vitro Investigation on Poly(lactide)-Tween 80 Copolymer Nanoparticles Fabricated by Dialysis Method for Chemotherapy. *Biomacromolecules*. 2006;7(4):1139-46.
176. Sahin A, Esendagli G, Yerlikaya F, Caban-Toktas S, Yoyen-Ermis D, Horzum U, et al. A small variation in average particle size of PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation leads to considerable change in nanoparticles' characteristics and efficacy of intracellular delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2017;45(8):1657-64.
177. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;75(1):1-18.
178. Turk CTS, Oz UC, Serim TM, Hascicek C. Formulation and Optimization of Nonionic Surfactants Emulsified Nimesulide-Loaded PLGA-Based Nanoparticles by Design of Experiments. *AAPS PharmSciTech*. 2014;15(1):161-76.
179. Cooper DL, Harirforoosh S. Design and Optimization of PLGA-Based Diclofenac Loaded Nanoparticles. *PLOS ONE*. 2014;9(1):e87326.

180. Shadabul H, Ben JB, Michelle PM, Colin WP, Lisa MK, Michael W. Suggested Procedures for the Reproducible Synthesis of Poly(d,l-lactide-co-glycolide) Nanoparticles Using the Emulsification Solvent Diffusion Platform. *Current Nanoscience*. 2018;14(5):448-53.
181. Haque S, Boyd BJ, McIntosh MP, Pouton CW, Kaminskas LM, Whittaker M. Suggested Procedures for the Reproducible Synthesis of Poly(d,l-lactide-co-glycolide) Nanoparticles Using the Emulsification Solvent Diffusion Platform. *Current nanoscience*. 2018;14(5):448-53.
182. Huang W, Zhang C. Tuning the Size of Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles Fabricated by Nanoprecipitation. *Biotechnol J*. 2018;13(1):10.1002/biot.201700203.
183. Tonbul H, Ultav G, Akbaş S, Sahin A, Aktaş Y, Capan Y. Synthesis of Small-Sized Mesoporous Silica Nanoparticles by Experimental Design and Characterization for Further Drug Delivery. *LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY*. 2019;38:2204-10.
184. Arzani H, Adabi M, Mosafar J, Dorkoosh F, Khosravani M, Maleki H, et al. Preparation of curcumin-loaded PLGA nanoparticles and investigation of its cytotoxicity effects on human glioblastoma U87MG cells. 2019;9(5):4225-31.
185. Kim K-T, Lee J-Y, Kim D-D, Yoon I-S, Cho H-JJP. Recent Progress in the Development of Poly (lactic-co-glycolic acid)-Based Nanostructures for Cancer Imaging and Therapy. 2019;11(6):280.
186. Keum C-G, Noh Y-W, Baek J-S, Lim J-H, Hwang C-J, Na Y-G, et al. Practical preparation procedures for docetaxel-loaded nanoparticles using polylactic acid-co-glycolic acid. *International journal of nanomedicine*. 2011;6:2225-34.
187. Chopra M, Jain R, Dewangan AK, Varkey S, Mazumder SJJON, Nanotechnology. Design of curcumin loaded polymeric nanoparticles-optimization, formulation and characterization. 2016;16(9):9432-42.
188. Sahu BP, Hazarika H, Bharadwaj R, Loying P, Baishya R, Dash S, et al. Curcumin-docetaxel co-loaded nanosuspension for enhanced anti-breast cancer activity. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2016;13(8):1065-74.
189. Commandeur JN, Vermeulen NP. Cytotoxicity and cytoprotective activities of natural compounds. The case of curcumin. *Xenobiotica*. 1996;26(7):667-80.
190. Keum CG, Noh YW, Baek JS, Lim JH, Hwang CJ, Na YG, et al. Practical preparation procedures for docetaxel-loaded nanoparticles using polylactic acid-co-glycolic acid. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2225-34.
191. Scholes PD, Coombes AG, Illum L, Davis SS, Watts JF, Ustariz C, et al. Detection and determination of surface levels of poloxamer and PVA surfactant on biodegradable nanospheres using SSIMS and XPS. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 1999;59(3):261-78.
192. Esmaeili F, Atyabi F, Dinarvand R. Preparation and characterization of estradiol-loaded PLGA nanoparticles using homogenization-solvent diffusion method. 2008.
193. Koopaei MN, Dinarvand R, Amini M, Rabbani H, Emami S, Ostad SN, et al. Docetaxel immunonanocarriers as targeted delivery systems for HER 2-positive tumor cells: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:1903-12.
194. Musumeci T, Ventura CA, Giannone I, Ruozi B, Montenegro L, Pignatello R, et al. PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *Int J Pharm*. 2006;325(1-2):172-9.
195. Senthilkumar M, Mishra P, Jain NK. Long circulating PEGylated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticulate delivery of Docetaxel to solid tumors. *J Drug Target*. 2008;16(5):424-35.

196. Verderio P, Bonetti P, Colombo M, Pandolfi L, Prosperi D. Intracellular drug release from curcumin-loaded PLGA nanoparticles induces G2/M block in breast cancer cells. *Biomacromolecules*. 2013;14(3):672-82.
197. 5 - Mathematical models of drug release. In: Bruschi ML, editor. *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*: Woodhead Publishing; 2015. p. 63-86.
198. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*. 2011;3(3):1377-97.
199. Bouissou C, Rouse JJ, Price R, van der Walle CF. The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. *Pharm Res*. 2006;23(6):1295-305.
200. Ruhe PQ, Hedberg EL, Padron NT, Spauwen PH, Jansen JA, Mikos AG. rhBMP-2 release from injectable poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium-phosphate cement composites. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2003;85-A Suppl 3:75-81.
201. Xiong S, George S, Yu H, Damoiseaux R, France B, Ng KW, et al. Size influences the cytotoxicity of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles. *Archives of toxicology*. 2013;87(6):1075-86.
202. Zhang B, Sai Lung P, Zhao S, Chu Z, Chrzanowski W, Li Q. Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells. *Scientific reports*. 2017;7(1):7315-.
203. Banerjee S, Singh SK, Chowdhury I, Lillard JW, Jr., Singh R. Combinatorial effect of curcumin with docetaxel modulates apoptotic and cell survival molecules in prostate cancer. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. 2017;9:235-45.
204. Liu Z, Huang P, Law S, Tian H, Leung W, Xu C. Preventive Effect of Curcumin Against Chemotherapy-Induced Side-Effects. *Front Pharmacol*. 2018;9:1374-.
205. Hossain M, Banik NL, Ray SK. Synergistic anti-cancer mechanisms of curcumin and paclitaxel for growth inhibition of human brain tumor stem cells and LN18 and U138MG cells. *Neurochem Int*. 2012;61(7):1102-13.
206. Perry MC, Demeule M, Regina A, Moumdjian R, Beliveau R. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(8):1192-201.
207. Liao H, Wang Z, Deng Z, Ren H, Li X. Curcumin inhibits lung cancer invasion and metastasis by attenuating GLUT1/MT1-MMP/MMP2 pathway. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(6):8948-57.
208. Sobolewski C, Muller F, Cerella C, Dicato M, Diederich M. Celecoxib prevents curcumin-induced apoptosis in a hematopoietic cancer cell model. 2015;54(10):999-1013.
209. Zhou QM, Wang XF, Liu XJ, Zhang H, Lu YY, Huang S, et al. Curcumin improves MMC-based chemotherapy by simultaneously sensitising cancer cells to MMC and reducing MMC-associated side-effects. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2011;47(14):2240-7.
210. Mendonca LM, da Silva Machado C, Teixeira CC, de Freitas LA, Bianchi Mde L, Antunes LM. Curcumin reduces cisplatin-induced neurotoxicity in NGF-differentiated PC12 cells. *Neurotoxicology*. 2013;34:205-11.
211. Şimşek S, Eroğlu H, Kurum B, Ulubayram K. Brain targeting of Atorvastatin loaded amphiphilic PLGA-b-PEG nanoparticles. *Journal of microencapsulation*. 2013;30(1):10-20.
212. Ling Y, Wei K, Zou F, Zhong S. Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;430(1):266-75.
213. Tahara K, Yamamoto H, Kawashima Y. Cellular uptake mechanisms and intracellular distributions of polysorbate 80-modified poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanospheres for gene delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;75(2):218-24.

214. Tahara K, Kato Y, Yamamoto H, Kreuter J, Kawashima Y. Intracellular drug delivery using polysorbate 80-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres to glioblastoma cells. *Journal of microencapsulation*. 2011;28(1):29-36.
215. Escalona-Rayo O, Fuentes-Vázquez P, Jardon-Xicotencatl S, García-Tovar CG, Mendoza-Elvira S, Quintanar-Guerrero D. Rapamycin-loaded polysorbate 80-coated PLGA nanoparticles: Optimization of formulation variables and in vitro anti-glioma assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;52:488-99.